

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA  
UNAN-MANAGUA  
INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD  
Dr. LUIS FELIPE MONCADA**



**Monografía para optar al título de licenciatura en Bioanálisis Clínico**

**TEMA:**

Análisis de la comparación del método estándar ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de *Salmonella spp* en carne molida, CNDR-MINSA, Noviembre Diciembre 2014.

**AUTORES:**

**Br.** Martha Irene Romero Quintero

**Br.** Edgard Alfonso Sánchez Pavón

**Br.** Jessica Valeria López Aburto

**TUTOR**

Isaac Abraham Martínez Marcia  
MSC. Microbiología Médica UNAN-León

**ASESOR METODOLÓGICO**

Francisco Enrique Romero Oviedo  
MSC. Microbiología Médica UNAN-León

**Managua, 02 de Marzo del 2015**

## DEDICATORIA

### ***Martha Irene Romero Quintero***

A mi madre, mejor amiga y pilar ***Martha Lorena Quintero Villanueva*** a quien le dedico todos mis días de lucha por lograr mis metas, quien me enseñó a ser quién soy y a instruirme no para saber más ni ser mejor que otros sino para superarme a mí misma. Por ser ejemplo de superación, fuerza, lealtad y en honor a sus años de sacrificio ya que este logro es más suyo que mío.

### ***Edgard Alfonso Sánchez Pavón***

Para esa persona quien estuvo ahí conmigo desde el inicio, demostrándome su fuerza y su amor, este trabajo se lo dedico a mi madre ***Marina Isabel Pavón Pavón*** quien me enseñó que el éxito en la vida no se mide por lo que logras, si no por los obstáculos que superas, también a todas aquellas personas especiales que me han apoyado y guiado en todo este proceso.

### ***Jessica Valeria López Aburto***

A mi madre ***Giselle Aburto*** por ser el pilar más importante en mi vida, por la entrega incondicional y todo el sacrificio que hizo a lo largo de estos cinco años para que lograra culminar esta carrera.

A mi padre ***Adalid López***, Hermanos y amigos que depositaron su confianza en mí y me brindaron consejos a cada momento.

A mi hija ***Lía Alexandra Vásquez López*** por ser el motor de mi vida que me guía a seguir a delante y a mi esposo ***Jackson Alexander Vásquez*** por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo incondicional.

## AGRADECIMIENTO

Lo que parecía que nunca iba a suceder por fin ocurre y con ello acaba una etapa y empieza otra. Tanto de la que acaba como de la que empieza, mucho tenemos y tendremos que agradecer en primer lugar a ***Dios nuestro creador*** por habernos dado la fuerza y la sabiduría necesaria para la realización de nuestro trabajo monográfico. Además a muchas personas sin las cuales no creo que este momento hubiera llegado.

Tenemos el gusto de poder agradecer a:

***Nuestros padres*** quienes de manera incondicional nos han apoyado desde nuestros inicios y amorosamente nos alentaban a seguir hacia delante.

***Msc. Isaac Abraham Martínez Marcia***, nuestro tutor de tesis. Por sus pensamientos positivos en todo momento, sus buenas ideas, comprensión trabajo y dedicación a pesar de tener que cumplir con obligaciones propias. Por enseñarnos que:

“Con las dificultades no se puede pactar, o las vencemos o nos vencen”. Sin usted esta tesis no habría llegado a realizarse”

***Msc. Francisco Enrique Romero Oviedo***, Asesor metodológico quien con su exigente manera de enseñar nos mostró que siempre debemos estar dispuestos si realmente se quiere lograr un objetivo y hacer lo que fuese necesario.

También agradecemos a cada una de las personas que nos brindaron su apoyo en la realización de este estudio en especial al ***Dr. Ángel Balmaceda***.

Así mismo queremos agradecer a la ***Tec. Yolanda Solórzano*** responsable del área y a su ***equipo de trabajo*** que contribuyeron en la realización de medios de cultivo que utilizamos para nuestro estudio.

*A todos muchas gracias....*

## OPINIÓN DEL TUTOR

El presente trabajo investigativo ha sido elaborado con el propósito de comparar el método convencional ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de *Salmonella spp* en carne molida, CNDR-MINSA, Noviembre a Diciembre 2014.

Esta investigación por lo tanto es un reconocimiento al esfuerzo humano y un logro en el avance para el departamento de Agua y Alimento CNDR-MINSA y la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua. UNAN-Managua.

Como tutor apruebo esta investigación para que sea defendida por sus autores con el tema monográfico.

“Análisis de la comparación del método estándar ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de *Salmonella spp* en carne molida, CNDR-MINSA, Noviembre Diciembre 2014”.

### AUTORES:

**Br.** Martha Irene Romero Quintero

**Br.** Edgard Alfonso Sánchez Pavón

**Br.** Jessica Valeria López Aburto

Isaac Abraham Martínez Marcia  
Lic. Bioanálisis Clínico UNAN-Managua  
**TUTOR**

~ v ~

## RESUMEN

*Salmonella* es un género de bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, actualmente contempla cerca de 2700 serovares. Son bacilos Gram negativos, aerobios facultativos, móviles con flagelos, productores de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>S). Su hábitat fundamental es el tracto intestinal de personas y animales. Es transmitida a través de alimentos, agua y por vía fecal oral siendo la carne molida uno de los principales vehículos de transmisión debido al incumplimiento de las Normas Técnicas Obligatorias (NTON-0307808), las cuales agrupan una serie de medidas de higiene, condiciones de transporte e infraestructura del expendio.

Es por tal razón que se hizo necesario el desarrollo de esta investigación donde el objetivo principal fue el Análisis de la comparación del método convencional ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de *Salmonella spp* en carne molida, CNDR-MINSA, Noviembre Diciembre 2014

Se realizó un estudio descriptivo de corte transversal, no probabilístico por conveniencia. De 39 tramos distribuidores de carne se recolectó un total de 25 muestras de carne molida que correspondieron a los 5 lotes en estudio. De las cuales se obtuvo 100% de positividad por ambos métodos, lo que demostró la alta sensibilidad de la PCR Tiempo Real como prueba de tamizaje para la detección de este agente patógeno.

Por otra parte deben ser consideradas como principal paso a seguir el cumplimiento de medidas higiénicas por los distribuidores en el procesamiento, transporte y manipulación ya que de ello depende en gran manera la contaminación del producto. Así como la vigilancia constante por parte del MINSA para garantizar su cumplimiento y la utilización de la PCR Tiempo Rea ya que por los resultados obtenidos en el estudio confirma ser una valiosa prueba de tamizaje con igual sensibilidad que el método convencional en la búsqueda de *Salmonella spp*.

## INDICE

<b>DEDICATORIA.....</b>	<b>ii</b>
<b>AGRADECIMIENTO .....</b>	<b>iii</b>
<b>OPINIÓN DEL TUTOR .....</b>	<b>v</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>vi</b>
<b>III. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>6</b>
<b>V. OBJETIVOS.....</b>	<b>7</b>
<b>VI. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>8</b>
<b>6.1 Generalidades .....</b>	<b>8</b>
<b>6.2 Métodos para la detección de Salmonella spp .....</b>	<b>25</b>
<b>VII. DISEÑO METODOLÓGICO.....</b>	<b>37</b>
<b>7.2 Extracción del ADN Bacteriano .....</b>	<b>43</b>
<b>7.3 PCR en Tiempo Real .....</b>	<b>44</b>
<b>VIII. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLE.....</b>	<b>45</b>
<b>IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
<b>X. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>XI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>55</b>
<b>XIII. ABREVIATURAS.....</b>	<b>57</b>
<b>XV. ANEXOS.....</b>	<b>60</b>

## LISTA DE CUADROS Y GRÁFICOS

	pág.
<b>Tabla 1.</b> Condiciones de crecimiento de <i>Salmonella spp</i> .....	11
<b>Tabla 2</b> Rangos de pH donde puede crecer <i>Salmonella spp</i> en función del tipo de ácido empleado.....	12
<b>Tabla 3. .</b> Reactivos para la detección de gen <i>ttr-5</i> .....	43
<b>Análisis y discusión</b>	
<b>Tabla 1.</b> Aislamiento y detección de <i>Salmonella spp</i> en carnes molidas .....	48
<b>Tabla 2</b> Porcentaje de eficacia de los métodos de extracción de ADN bacteriano. A partir del caldo de enriquecimiento no Selectivo APB y Caldo de enriquecimiento Selectivo Rappaport Vassiliadis.....	50
<b>Grafico 1.</b> Positividad en las muestras durante el análisis por PCR-Tiempo Real.....	52
<b>Tabla 3</b> Diferencias entre parámetros estadísticos (Sensibilidad y Valor Predictivos Positivo), factores de costo y tiempo en la utilización del método estándar y el PCR Tiempo Real para la determinación de <i>Salmonella spp</i> en cárnico.....	52



## I. INTRODUCCIÓN

Los alimentos son productos no estériles y pueden ser contaminados en cualquier etapa del proceso por bacterias y sus toxinas siendo un riesgo para la salud del consumidor. Las ETA son términos que se aplican a todas las enfermedades que se adquieren por medio del consumo de dichos alimentos contaminados entre estos se encuentra la carne de res con una composición química compleja y variable dependiendo de una serie de valores intrínsecos y extrínsecos, el conocimiento de su composición y la manera en que estos componentes se vean afectados por condiciones de manipulación, procesamiento y almacenamiento determinara finalmente su valor nutricional, durabilidad y grado de aceptación del consumidor. (Norma Internacional ISO 6579-2002) La vigilancia contra *Salmonella spp* en todas las etapas de la cadena de procesamiento de alimentos, constituye un elemento importante en la investigación de la epidemiología de la Salmonelosis.

El género *Salmonella* está constituido por un grupo de microorganismos con una mayor diversidad bioquímica y serológica. Pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram negativos, anaerobios facultativos, no formadores de esporas, fermentan glucosa, oxidasa negativa y reducen nitratos a nitritos.(Mejía, 2003). Este género está constituido por 2 especies: *Salmonella entérica* y *Salmonella bongori*. A su vez se dividen en más de 2700 serovariedades entre los cuales los más representativos son *S. enteritidis* y *Typhimurium*, definido en función de diferentes asociaciones de factores antigénicos somáticos O y flagelares H.

La infección causada por esta bacteria es conocida como Salmonelosis se puede manifestar como dos procesos patológicos diferentes: Fiebre tifoidea o Gastroenteritis. Los huéspedes naturales de la *Salmonella spp*. Incluyen seres humanos, animales de granja, domésticos y silvestres.(Méndez, Badillo, Ortiz Parra, & Faccini, 2010)

Según la OMS *Salmonella spp* es uno de 7 principales patógenos que pueden encontrarse en los alimentos ubicándose así como el principal microorganismo bacteriano implicado en un 46,9% dentro del espectro de las ETA.(AGUILAR A, 2011)

Existe gran variedad de métodos diagnósticos que pueden realizarse para la determinación de *Salmonella spp.* Como la establecida por la Norma ISO 6579 2002 y la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en Tiempo Real. Según la mayor parte de estudios, el cultivo microbiológico es la prueba Gold estándar para el aislamiento de *Salmonella spp.* en alimento. Este consta de 3 etapas sucesivas las cuales son: Enriquecimiento no selectivo, Enriquecimiento selectivo y aislamiento por medios sólidos selectivos y diferenciales. Posteriormente se lleva a cabo el estudio de las características bioquímicas de las colonias sospechosas en los medios adecuados para su identificación y análisis.(OMS, 2007)

El avance en la biotecnología también ha permitido el desarrollo de diversos métodos alternativos, los cuales proporcionan ventajas en cuanto a eficiencia, sensibilidad y disminución del tiempo de detección. Estos métodos rápidos, por estar basados en la determinación de ácidos nucleicos, tienen la potencialidad de ser muy específicos. Tal es el caso de la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Tiempo Real (real time PCR); que tiene la ventaja de llevar a cabo simultáneamente los procesos de amplificación y detección en el mismo vial y determinar la cantidad de ADN sintetizado en cada momento de la reacción.(Rubio, Martínez, & Hernández, 2013)

En Nicaragua, el CNDR-MINSA ha implementado nuevas tecnologías como la biología molecular para el diagnóstico de agentes patógenos para el ser humano. Desde los años 90 La PCR convencional se ha aplicado en el área de parasitología con ayuda del PNUD, el banco mundial y la OMS en el programa especial de investigaciones y enseñanza sobre enfermedades tropicales TDR. En el año 2008 con la cooperación de la Unión Europea se aplica PCR Tiempo Real la cual modificó el diagnóstico emitido por dicha área ofreciendo ventajas y facilidades.

## II.

## ANTECEDENTES

El Proyecto “WHO Global Salm-Surv” fue creado en el año 2000 por la OMS para el estudio, detección de brotes y control de enfermedades alimentarias de 142 países. Durante el año 2006, se conocieron los resultados obtenidos en el marco del mencionado Proyecto, entre los que se muestra una estimación de dos millones de personas al año fallecidas por causa de enfermedades diarreicas atribuidas a alimentos contaminados entre los cuales se encuentran las carnes rojas.(OMS, 2007)

En México se realizó una exploración por parte de la revista “México Ciencia” la cual divulgó un artículo con el tema Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México por método de PCR. Para este estudio se obtuvieron 90 muestras de carne de res: 30 muestras procedentes del norte, 20 del centro y 40 del sur. De éstas, el 50 % fueron nacionales y el otro 50% fueron importadas. El resultado obtenido para carnes nacionales fué de: 27.78 % para *L. monocytogenes*, 8.89 % para *Salmonella* y 28.89 % para *Y. enterocolitica*. Por otra parte las carnes importadas resultaron negativas para los patógenos en los tres estados en estudio.(Rubio, Martínez, & Hernández, 2013)

EL artículo publicado por la Revista INFECTIO de la asociación colombiana de infectología en 2008 afirma haber realizado una investigación con fin en determinar *Salmonella spp* por PCR tiempo real y método convencional en canales de bovino de una planta certificada y en alimentos de la vía pública en el que se analizaron 311 muestras, 256 de la vía pública y 55 de una planta de beneficio animal. Aislándose *Salmonella spp* en 16,1% de las muestras, PCR-Tiempo Real (PCR-RT) con un 68% positivos y el método convencional con un 48%. Los alimentos expendidos en la vía pública que presentaron mayor contaminación por *Salmonella spp*. Fueron: chorizos con 28,1% por PCR-TR y 12,3% por el método convencional; cerdo con 23,1% por PCR-TR y 15,4% por el método convencional, carne molida con 9,3% por PCR-TR y 15,6% por el método convencional. En canales de bovinos la presencia de *Salmonella spp*. Fue de 1,8%.(Yáñez, Máttar, & Durango, 2008)

Según un artículo informativo publicado por un boletín de intoxicaciones alimentarias en el año 2012 un brote de *Salmonella* en Bloomington, Illinois enfermó a 12 personas, algunas de las cuales presentaron malestares después de comer en McDonald's, según el Departamento de Salud del Condado de McLean (MCHD) durante su investigación, los funcionarios de salud no encontraron contaminación en los alimentos o las superficies ambientales, pero fueron capaces de determinar a partir de las entrevistas que el origen del brote podría haber venido de un empleado o empleados que trabajaron sus turnos mientras estaban enfermos.(Gillespie, 2012)

En los Estados Unidos en el año 2013 las autoridades federales de salud reportaron que al menos 16 personas en cinco estados Michigan, Arizona, Illinois, Iowa y Wisconsin se habían enfermado por comer carne molida contaminada con *Salmonella*. Cerca de la mitad de estas personas tuvieron que ser hospitalizadas, pero ninguna murió. Siete de las personas afectadas comieron Kibbeh un platillo de carne molida cruda en un restaurante sin nombre en Detroit. De acuerdo con el Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), el brote está relacionado con el reciente retiro de más de 1,000 libras de carne molida de Gab Halal Foods y Jouni Meats, ambas con sede en Michigan.(Mercola, 2013)

Por otra parte este es el primer trabajo de campo realizado en el Departamento de Agua y Alimento en el CNDR-MINSA en lo que se refiere al aislamiento y detección de *Salmonella spp* en carne molida por técnicas de biología molecular y convencional. Otro estudio similar encontrado fue el de Comparación de la PCR Tiempo Real y convencional ISO 6579-2002 para piezas de pollo crudo en el año 2013 realizado por estudiantes de la UNAN-MANAGUA en el mismo departamento. El que aportó información acerca de la inocuidad del pollo con respecto a *Salmonella spp*.

### III.JUSTIFICACIÓN

Los productos cárnicos son el segundo alimento de mayor demanda en los mercados capitalinos dado a su elevado contenido nutricional. Según los informes y registros del MINSA estos forman parte de los productos más vinculados a Enfermedades Transmitidas por Alimentos en Nicaragua, además afirman que los sitios que originan las mismas son: Los hogares, los comedores populares (fritangas) y las escuelas.(Gutiérrez, 2009)

*Salmonella spp*, por tanto es uno de los principales agentes que causa intoxicación alimentaria en los seres humanos por lo que fue necesaria una investigación detallada en las carnes molidas ya que este alimento tiene mayor posibilidad de contaminación cruzada, por sus características propias de limpieza y desinfección incorrecta además de ser un producto de mucha manipulación.

Por tal motivo se efectuó este estudio, con el objetivo de comparar el método de aislamiento (ISO-6579-2002) con el PCR Tiempo Real (Prueba alternativa) para la detección de *Salmonella spp* en carne molida, mejorando la calidad en el diagnóstico del CNDR- MINSA.

#### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿Estarán las carnes molidas comercializadas en el Mercado Iván Montenegro de Managua contaminadas con *Salmonella spp*?

¿Será la PCR tiempo Real una prueba de tamizaje alternativa en comparación al método convencional 6579-2002 para la detección de *Salmonella spp* en carne molida?

## V. OBJETIVOS

### Objetivo general

Comparar el método convencional ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de tamizaje para la detección de *Salmonella spp* en carnes molidas durante el periodo Noviembre y Diciembre del año 2014.

### Objetivos específicos

- Aislar e Identificar la presencia de *Salmonella spp* en carnes molidas del Mercado Iván Montenegro de Managua por los dos métodos utilizado.
- Determinar cuál de los dos métodos de extracción de ADN bacteriano utilizado es más efectivo para la detección de *Salmonella spp* en carne molida a partir del pre-enriquecimiento en Agua Peptonada Bufferada y enriquecimiento en caldo Rappaport Vassiliadis.
- Analizar las diferencias entre parámetros estadísticos (Sensibilidad y Valor Predictivo Positivo), factores de costo directos de material y tiempo en la utilización del método estándar y el PCR Tiempo Real para la determinación de *Salmonella spp* en cárnico.

## VI. MARCO TEÓRICO

### 6.1 Generalidades

#### 6.1.2 Características

*Salmonella* es un género de bacterias que pertenecen a la familia *enterobacteriaceae*, actualmente contempla cerca de 2700 serovares. Son bacilos gramnegativos de 0,7-1,5 x 2-5 µm de tamaño, aerobios facultativos, móviles con flagelos peritricos con excepción de la serovariedad *Gallinarum-Pollorum*, no desarrollan cápsula excepto la especie *S. typhi*, producen ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>S). Su hábitat fundamental es el tracto intestinal de personas y animales. (Ministerio de salud, 2011)

Las pruebas bioquímicas para la detección de *Salmonella spp* muestra que fermentan la glucosa, no fermentan lactosa ni la sacarosa, son anaerobias facultativas, no producen indol y suelen producir sulfuro de hidrógeno. Son bacterias de crecimiento rápido, crecen en medios diferenciales como MacConkey y en los altamente selectivos como Agar XLD, Sulfito Bismuto y Hektoen entérico en lo que alimento se refiere, así como en medios altamente inhibidores como Selenito. Poseen propiedades invasivas como exotóxicas y endotóxicas. La principal forma de transmisión es a través de los alimentos. De las formas clínicas, las más comunes son la fiebre tifoidea y paratifoidea producidas por *Salmonella Typhi* y *Paratyphi A*. De las asociadas a infección del torrente sanguíneo uno de los serotipos más comunes es *Salmonella Choleraesuis*. Sin embargo, la forma clínica más frecuente es la diarrea asociada a más de 1,500 serotipos. Estos procesos requieren manejo terapéutico distinto por tener morbi-mortalidad distinta. (López Cruz, y otros, 2004)

#### 6.1.3 Taxonomía

El género *Salmonella* fué nombrada Daniel Elmer Salmon, un patólogo veterinario norteamericano. Mientras Theobald Smith descubrió la bacteria de tipo real ("*Salmonella Typhimurium*" *Choleraesuis* var) en 1885, el Dr. Salmon fué el administrador del programa



de investigación del USDA, y por lo tanto el organismo es nombrado en su honor.(New medical., 2014)

Clásicamente se distinguían tres únicas especies patógenas primarias: *S. typhi*, *S. choleraesuis* y *S. enteritidis*

El tratamiento taxonómico actual de *Salmonella* ha simplificado el espectro y reagrupado así todas las cepas (patógenas o no) en dos únicas especies: *S. enterica* y *S. bongori*. Subdivididas en subespecies y serovares. Para evitar confusiones, *S. enteritica* serovar *typhimurium* aún se identifica como *S. typhi*. Esta se caracteriza por su antígeno flagelar (H), antígeno O (LPS - lipopolisacárido) y un antígeno polisacárido capsular de virulencia (Vi). Esta última (antes subespecie V) no es patógena para el ser humano. Diferenciables entre sí por características metabólicas tales como la hidrólisis del ONPG, el crecimiento en presencia de KCN. Además que *Salmonella enterica* subespecie entérica agrupa a la mayoría de las bacterias de este género que se asocian con animales de sangre caliente y con el hombre, mientras que las demás subespecies y también *S. bongori* son habitantes del ambiente y se asocian con animales de sangre fría.(Depto. Bacteriología y Virología, 2002)

#### **6.1.4 Nomenclatura**

Debido a la diversidad de los serovares identificados, la Organización Mundial de la Salud (OMS) han propuesto una clasificación basada en las combinaciones de los antígenos que posee somático (O), flagelar (H) y capsular (K), este sistema se conoce como el Kauffman-White.

Los serovares de *Salmonella enterica* son normalmente escritos por su nombre corto, el cual incluye el nombre del serovar, por ejemplo: *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* se denota como *S. Typhimurium*. Adicionalmente, los subtipos son útiles para conocer la distribución geográfica de este microorganismo y estos se realizan mediante fagos específicos. Esta clasificación se escribe con números de fagotipo (PT) o fagotipo definitivo (DT). Los dos términos son intercambiables en la literatura y pueden usarse indistintamente.(Ministerio de protección social. INS, 2011)

Los antígenos somáticos son termoestables y su especificidad radica en el componente polisacárido de la endotoxina, complejo proteína-lipopolisacárido. Los antígenos O se clasifican en mayores y menores; los mayores son los que definen un grupo antigénico. Así, el factor antigénico 0:4 caracteriza el antiguo grupo B, hoy llamado O: 4, mientras que los antígenos menores tienen menor valor discriminativo.

Los antígenos capsulares o de envoltura sólo lo presentan algunos serotipos de *Salmonella* (*Typhi* y *Dublin*).

Los antígenos flagelares son proteicos y termolábiles. Algunos serovares sólo producen un único tipo de antígeno H, siendo en consecuencia, monofásicos. Sin embargo otros serotipos pueden producir alternativamente dos tipos de antígenos H, por lo que se denominan bifásicos.

Mediante el uso de reacciones antígeno anticuerpo se determina la fórmula antigénica de una cepa y, a partir de dicha fórmula, se la clasifica en serovar o serotipo siguiendo el esquema propuesto originalmente por Kauffman y White (que agrupa todas las serovariedades conocidas, más de dos mil setecientos).(Depto. Bacteriología y Virología, 2002)

#### **6.1.5 Características de crecimiento, sobrevivencia e inactivación**

##### **Crecimiento**

###### **Temperatura**

*Salmonella* puede crecer entre 7-49°C, su crecimiento se ve reducido a < 15°C. Al evaluar la temperatura de este microorganismo, señalan que puede crecer a 5.9 °C, sin embargo, estos datos no son concluyentes porque dependen del serovar y el medio de cultivo donde se inocular.

## pH

*Salmonella* crece a un pH que varía entre 4-9, la tolerancia al ácido depende del tipo y tamaño del ácido al cual se expone el microorganismo, y por factores como la temperatura y sustancias como los nitritos. Ello explica que *Salmonella* se multiplique fácilmente dentro de los organismos animales, así como en alimentos frescos tales como carne, pescado, huevos, lácteos, etc.(Ministerio de protección social. INS, 2011)

## Condiciones atmosféricas

El crecimiento bajo atmósferas de nitrógeno es ligeramente menor a las condiciones aeróbicas. Puede crecer de 8-11°C con concentraciones de 20-50% de CO<sub>2</sub>, su crecimiento se ve retardado cuando hay un 80% de CO<sub>2</sub> en el aire.

## Actividad de agua (a<sub>w</sub>)

*Salmonella* puede multiplicarse en a<sub>w</sub> que van desde 0.94 hasta 0.995 y puede persistir en alimentos con a<sub>w</sub> inferiores a 0.94 como chocolate, nueces y mantequilla de maní.

**Tabla 1.** Condiciones de crecimiento de *Salmonella* spp.

Características	Máxima	Mínimo	Optimas
Temperatura	49,5°C	5,9 °C su crecimiento se ve reducido a <15°C	35-37°C
pH	9.5	3.8	6.5-7.5
Actividad de agua (a <sub>w</sub> )		0.95	0.995

Se han encontrado algunos serovares capaces de multiplicarse a 54°C y crecer 5,9°C en medios de cultivo.

## Sobrevivencia

Se sabe que *Salmonella* crece bien en alimentos (especialmente si tiene un alto contenido de proteína como el pollo, huevo y carnes), así como en superficies de la industria de alimentos. La habilidad de *Salmonella* para sobrevivir en la cadena agroalimentaria se debe en parte a su capacidad para responder efectivamente a los cambios medioambientales.

### Temperatura

Puede sobrevivir por largos periodos a temperatura de refrigeración, especialmente en alimentos que tengan grasa, estudios señalan que pueden sobrevivir por encima de 5°C. Algunos alimentos especialmente las carnes parecen tener un efecto protector para *Salmonella* durante procesos de congelación, asociados a su contenido de grasa.

### Concentración de sal

Generalmente es sensible a altas concentraciones de sal (9%), aunque puede crecer en productos que tengan 3% de cloruro de sodio.(Ministerio de protección social. INS, 2011)

### pH

Es importante señalar en función de la serovariedad *S. Typhimurium* es la más resistente hasta ahora reportada.

**Tabla 2.** Rangos de pH donde puede crecer *Salmonella* en función del tipo de ácido empleado

Tipo de pH	pH mínimo
Ácido clorhídrico	4.05
Ácido cítrico	4.05

<b>Acido tartárico</b>	4.1
<b>Ácido glucónico</b>	4.2
<b>Ácido fumárico</b>	4.3
<b>Ácido málico</b>	4.3
<b>Ácido láctico</b>	4.4
<b>Acido succínico</b>	4.6
<b>Ácido glutárico</b>	4.7
<b>Ácido adipico</b>	5.1
<b>Ácido pimélico</b>	5.1
<b>Ácido acético</b>	5,4
<b>Ácido propiónico</b>	5,5

## **Inactivación**

### Temperatura

La muerte de la *Salmonella* puede presentarse en los procesos de congelación, pero puede permanecer viable durante este proceso, por lo que debe tenerse en cuenta que la congelación no garantiza su muerte.

### Valor D

El valor D para *Salmonella* a 60°C es de 2-6 minutos (dependiendo del alimento) y a 70°C es de un minuto, el cual se altera por el contenido de grasa existente en el alimento. Algunos serovares son más resistentes, por ejemplo, *S. senftenberg*.

### Cloruro de sodio

Concentraciones superiores a 9% de cloruro de sodio resultan bactericidas para *Salmonella*.

#### Actividad de agua

El número de *Salmonella* disminuye a medida que disminuye el  $a_w$  de los alimentos. Valores bajos de  $a_w$  parecen tener un efecto protector sobre *Salmonella*.(Ministerio de protección social. INS, 2011)

#### pH

*Salmonella* no crece en pH inferiores a 4.0

#### Conservantes

*Salmonella* inhibe su crecimiento en presencia de 0.1% de ácido acético a pH 5,1. Los nitritos pueden ser eficaces para destruir a *Salmonella* siempre que su pH del alimento sea ácido.(OMS, 2007)

#### Radiación

Estudios con *S. Typhimurium* en carne inoculados con  $10^7$  células del microorganismo e irradiadas con 5 kG y, demostraron que esta dosis es capaz de inactivar  $10^6$ .

### 6.1.6 Patogenicidad

*Salmonella spp* es un microorganismo ampliamente distribuido en el mundo, pero la capacidad de que cause algún daño depende de varios factores entre los cuales está el tamaño del inóculo, factores de virulencia expresados por la cepa, hospedero involucrado y estado inmunológico del paciente.(Figueroa Ochoa & Verudugo Rodríguez, 2005).

El tamaño del inóculo de *Salmonella* requerido para causar enfermedad sintomática en adultos sanos no está bien establecido. En general, se necesita una inoculación relativamente grande, entre  $10^5$  y  $10^9$  organismos.(Romero Caballero & Herrera Benavente, 2002). Al ser ingerida dicha cantidad pasan al estómago, donde un pH bajo inhibe su multiplicación. Cuando el pH gástrico se torna más alcalino por el uso de antiácidos orales,

hay un incremento en la susceptibilidad a la infección intestinal. Los organismos que llegan al intestino delgado se topan con dos respuestas adicionales de defensa del huésped: la rapidez del tránsito intestinal y la flora bacteriana normal. Un tránsito intestinal normal disminuye el tiempo de contacto del organismo con la mucosa, y cuando la motilidad disminuye por factores anatómicos o por medicamentos, puede haber un incremento potencial de invasión por *Salmonella*.

La flora microbiana normal del intestino delgado compite por los requerimientos de crecimientos con los patógenos, mantiene el pH luminal bajo mediante la producción de ácidos grasos de cadenas cortas y produce sustancias antibacterianas, tales como la colicinas. Esto es cierto por la observación de que la administración de antibióticos de amplio espectro pueden exacerbar síntomas gastrointestinales o pueden lograr el estado de portador convaleciente. Los organismos que vencen estos mecanismos de defensa locales en el tracto gastrointestinal se adhieren a la mucosa y producen uno de los dos patrones de patogénesis: patrón secretor (diarrea líquida o acuosa), patrón invasor.

*Salmonella* es productora de diarrea aguda acuosa la mayoría de los serotipo de *salmonella* no tifoidea son consideradas cepas productoras de diarrea y causan gastroenteritis aguda sin invasión. Algunas se pueden multiplicar en el intestino delgado sin provocar ningún síntoma. Otras invaden la mucosa y producen enterotoxinas que ocasionan una diarrea de tipo secretor.. *Salmonella* pasa a través de la capa de células epiteliales hacia la lámina propia, donde provoca edema de la mucosa e inflamación.(Dr. Romero, 2007)

Patrón invasor *Salmonella typhi* es el serotipo de *Salmonella* invasiva más conocida. Los serotipos de *Salmonella no tifoidea* que típicamente son invasivos más conocidos. Los A y B, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella duplin* y *Salmonella oranienburg*. Estos organismos causan una enfermedad clínica llamada fiebre entérica, fiebre tifoidea o fiebre paratifoidea. Los efectos patogénicos son más extensos y usualmente más severos que lo producidos por los serotipos productores de diarrea.. En la lámina propia la respuesta predominante es la activación de células mononucleares y algunos microorganismos son fagocitados y transportados a los folículos linfoides intestinales locales (placas de ayer), a

los nódulos linfáticos regionales, al conducto torácico y a la circulación sistémica. De esta manera ocurre la diseminación por vía hematógena y las células retículo endoteliales del bazo y el hígado son infectadas.

#### Factores de Patogenicidad

*Salmonella spp.* Posee cuatro mecanismos para producir daño: los antígenos de superficie, la capacidad invasiva, la endotoxina de pared y la producción de enterotoxinas.

Los antígenos de superficie incluyen el antígeno VI, asociado a las cepas con más virulencia, que necesitan menor dosis infectantes para producir el padecimiento se le llama de esta manera al antígeno para indicar virulencia, es un factor antifagocitario.

Los antígeno O se consideran adhesinas que coadyuvan a la adherencia de la bacteria a las células de los tejidos. De esta forma funcionan las fimbrias de las cepas que tienen estas estructuras.

La capacidad invasiva es una característica que tienen algunas cepas, que les permite penetrar con mayor facilidad a las células y atravesar los epitelios para instalarse en la estructura de la submucosa y en los ganglios linfáticos. El mecanismo que favorece esta actividad no es bien conocido.

La endotoxina de pared es un polisacárido que se encuentra en la mayor parte de los miembros de esta familia. Produce necrosis focal en el sitio en el que se encuentra colonizando la bacteria, lo cual explica las úlceras que se reproducen en el intestino delgado.

La producción de enterotoxinas por algunas cepas se manifiesta por cuadro diarreico. Son consideradas similares a las enterotoxinas termolábiles de la *E. coli enterotoxigenica*.(Dr. Romero, 2007)



### 6.1.7 Inmunidad

Después de ser ingeridas y de pasar a través del estómago, las *Salmonellas* son capaces de invadir y de replicarse en las células M (micropliegues) que se localizan en las placas de Peyer de la región terminal del intestino delgado. Típicamente estas células transportan antígenos de cuerpos extraños hasta los macrófagos subyacentes para su eliminación. Dos sistemas separados de secreción de tipo III intervienen en la invasión inicial de la mucosa intestinal (isla de patogenicidad 1 de *Salmonella* [SPI-1]) y la enfermedad sistémica posterior (SPI-2).

La unión a las células M está mediada por las fimbrias específicas de especie. El sistema de secreción SPI-1 introduce después las proteínas de invasión secretadas por las bacterias (Sips o Ssps) en las células M, lo que da lugar a una reorganización de la actina de las células del organismo anfitrión con la consiguiente formación de ondulaciones en la membrana. Las membranas onduladas rodean y engullen a las *Salmonellas*, lo que permite su replicación intracelular en el fagosoma con ulterior destrucción de la célula anfitriona y extensión a células epiteliales adyacentes y al tejido linfoide.

La respuesta inflamatoria limita la infección al aparato digestivo, interviene en la liberación de prostaglandinas y estimula la secreción activa de AMPc y líquidos.

Las especies de *Salmonella* se protegen también de los ácidos del estómago y del pH ácido del fagosoma mediante un gen de respuesta de tolerancia a los ácidos (ATR). La catalasa y la superóxido dismutasa son otros factores que protegen a las bacterias frente a la destrucción intracelular.(Chien Wu, 2012)

### 6.1.8 Enfermedades y Formas clínicas

*Salmonella* es un patógeno asociado a enfermedades que afectan a un amplio rango de vertebrados. Algunas de ellas son patógenos estrictamente de humanos (*Salmonella* serotipo *Typhi*, serotipo *Paratyphi A, B o C*). Sin embargo la mayoría de los serotipos no están adaptados a un huésped específico. Generalmente la infección se adquiere por la

ingesta de agua o alimentos contaminados, tras lo cual se pueden dar tres posibilidades: la eliminación del microorganismo, la aparición del estado portador asintomático, o el desarrollo de la enfermedad con alguno de las diferentes formas clínicas.

Las formas clínicas de la infección pueden agruparse en cinco síndromes clínicos: infecciones asintomáticas agudas, gastroenteritis aguda, bacteriemia con o sin supuraciones locales, fiebre tifoidea, y estado de portador crónico asintomático. Los síntomas clínicos y los hallazgos clínicos de laboratorio de estos síntomas se superponen y pueden ser causado por cualquier serotipo de *Salmonella*, sin embargo, los primeros tres síndromes son generalmente causado por *Salmonella* no tifoidea y los dos últimos por *Salmonella typhi*. Los pacientes de cualquier grupo de edad pueden desarrollar alguno de los síndromes clínicos. (Murray & Rosenthal K., 2009)

#### Infecciones asintomáticas agudas.

La ingestión de un número pequeño de *Salmonella* puede producir a una infección asintomática. Los organismos son excretados por varios días y posteriormente eliminados por completo. Los lactantes y niños con infección asintomática son detectados por coprocultivo rutinario, colectado en estudios clínicos o investigaciones de brotes, la incidencia mundial de la infección asintomática es desconocida pero puede ser mayor que la de otros síndromes clínicos. (Dr. Romero, 2007)

#### Gastroenteritis aguda.

Es una padecimiento que se adquiere por la ingesta de diferentes alimentos contaminados son diferentes cepas de *Salmonella entérica*, como *Salmonella Typhimurium* aunque muchos otros agentes etiológicos pueden producir este cuadro clínico, las manifestaciones se inician a las 24 o 48 hrs., con diarrea severa, ruidos hidroaéreos, cólicos de diferente intensidad, náuseas y en ocasiones vómitos.

*Salmonella* se localiza exclusivamente en el intestino y tiene un mecanismo patogénico de tipo enteroinvasivo. Esto se debe a que *Salmonella* tiene la capacidad de colonizar la pared intestinal, dando lugar a desprendimiento de la mucosa y en ocasiones produce pequeñas

ulceras que pueden sangrar, lo que se manifiesta por un color más oscuro de las materias fecales semilíquidas o líquidas.

A menudo se refiere a este síndrome como “intoxicación por alimentos”. Esto puede ocurrir esporádicamente o en brotes que tienen su origen en aguas o alimentos contaminados. Después de un periodo de incubación de 6 a 48 horas empiezan los síntomas iniciales: náuseas, vómitos y cólicos abdominales. Esto es seguido por diarrea de intensidad moderada y que generalmente no presenta sangre. Los individuos con condiciones gastrointestinales especiales, como enfermedad inflamatoria del intestino, pueden presentar evacuaciones profusas acuosas y/o sanguinolentas.

En la forma aguda de la enfermedad se puede demostrar la afectación colónica. Los síntomas pueden persistir entre dos días y una semana antes de la resolución espontánea. (Méndez, Badillo, Ortiz Parra, & Faccini, 2010)

Este padecimiento es autolimitante, después de tres o cuatro días el paciente empieza a mejorar, y en solo pocos casos la diarrea se prolonga por más de una semana. Debido a que el padecimiento es asintomático, el tratamiento debe estar encaminado a restituir líquidos y a equilibrar los electrolitos. (Dr. Romero, 2007)

Los casos letales son excepcionales pero pueden ocurrir, sobre todo en pacientes ancianos ingresados en residencias geriátricas y en inmunodeprimidos. Tras la resolución del cuadro los pacientes pueden portar y eliminar *Salmonella spp.* Por las heces durante 4-5 semanas e incluso durante más tiempo, sobre todo si fueron tratados con antibioterapia. (Murray & Rosenthal K., 2009)

Bacteriemia con o sin supuraciones locales.

Algunas de las cepas de *Salmonella* invaden y se diseminan, causando bacteriemia aguda o intermitente. La infección se puede localizar en cualquier sitio anatómico del huésped a manera de complicación. (Dr. Romero, 2007)

## Septicemia

Todas las especies de *Salmonella* pueden dar lugar a bacteriemia, aunque las infecciones por *Salmonella typhi* y *S. Paratyphi A* son las que con mayor frecuencia la producen.

El riesgo de bacteriemia por *Salmonella* es más alto en pacientes pediátricos, geriátricos y en pacientes inmunodeprimidos (infectados por VIH, drepanocitosis e inmunodeficiencia congénita). La presentación clínica de la bacteriemia por *Salmonella* es idéntica a la de otras bacteriemias por gramnegativos, aunque pueden aparecer infecciones supurativas localizadas (osteomielitis, endocarditis y artritis), hasta en el 10% de los pacientes. (Murray & Rosenthal K., 2009)

Son cuadro clínico de alta gravedad, la invasión al torrente circulatorio y la colonización del tejido hemáticos hace desde un foco establecido en el intestino. El cuadro se inicia de forma brusca. Es frecuente que este padecimiento se complique con una coagulación intravascular diseminada causada por: lesión del endotelio que activa el actor XII de coagulación, lesión tisular que libera actores tromboplasticos que activan el sistema extrínseco de la coagulación, destrucción de eritrocitos y plaquetas que cuyos fosfolípidos activan los factores intrínseco y extrínsecos de coagulación, este cuadro se manifiesta en hemorragias, petequias y hematomas.

## Fiebre tifoidea

Se adquiere por la ingesta de alimentos contaminados por *Salmonella typhi* con inóculos de  $1 \times 10^9$  se tiene muy altas probabilidades de contraer la enfermedad. (Dr. Romero, 2007)

Una forma leve de esta enfermedad, la fiebre paratifoidea, se produce por *S. Paratyphi A*, *Salmonella schottmuelleri* (anteriormente conocida como *S Paratyphi B*) y *Salmonella hirschleldi* (anteriormente conocida como *S Paratyphi C*). Al contrario de lo que ocurre en otras infecciones por *Salmonella*, las bacterias responsables de la fiebre entérica pasan a través de las células que tapizan el intestino y son engullidas por los macrófagos. Se replica después de ser transportadas al hígado, el bazo y la médula ósea. Entre los diez y catorce días después de la ingestión de los bacilos, los pacientes presentan fiebre que va en aumento progresivamente, con síntomas inespecíficos como cefalea, mialgias, malestar

general y anorexia. Estos síntomas duran al menos una semana y son seguidos por síntomas gastrointestinales. Este ciclo se corresponde en una fase bacteriemia inicial que se sigue de la colonización de la vesícula biliar y posteriormente de la re infección del intestino. La fiebre entérica es una enfermedad clínica grave, que se debe sospechar en pacientes febriles que hayan viajado recientemente a países en vía de desarrollo en los que la enfermedad es endémica.

La transmisión se produce por vía fecal-oral y el hombre es el único reservorio. Las manifestaciones clínicas aparecen después de un periodo de incubación que varía entre 7 y 28 días, pudiendo aparecer diarrea o estreñimiento, fiebre prolongada y en agujas, dolor abdominal, dolor de cabeza y abatimiento.(Jurado, Arenas, Doblas, Rivero, & Torre, 2010)

#### **6.1.9 Epidemiología e Incidencia**

*Salmonella* se encuentra en prácticamente todos los animales como gallinas, reptiles, vacas, roedores, animales domésticos, aves, como comensal y patógeno en el tracto gastrointestinal de humanos. Ciertos serotipos como *Salmonella typhi* y *Salmonella Paratyphi*, están muy adaptadas al hombre y no causan enfermedades en otros huéspedes. Algunas cepas de *Salmonella* están adaptadas a los animales, pero cuando infectan a los humanos pueden causar enfermedad grave.

*Salmonella* es una de las principales causas de enfermedades gastroentericas en la mayoría de los países. Se estima que *Salmonella entérica* es responsable de alrededor de 1 millón de casos de enterocolitis y de 400 muertes al año en Estados Unidos.

La Fiebre Tifoidea, la más grave de las *Salmonellosis*, continúa siendo un problema mayor en muchos países en vías de desarrollo. Si bien resulta difícil conocer su real impacto, la OMS estima que, anualmente se registran diecisiete millones de casos anuales, con unas seiscientas mil muertes.

Desde 1995, año en que se implementó el programa V.E.T.A (Vigilancia de las Enfermedades Transmitidas por los Alimentos), se ha constatado un aumento en el número

de brotes denunciados; el Departamento de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud Pública estudió cinco brotes en el año 1995 y cuarenta y un brotes en el año 1999, constatándose en dicho lapso un Predominio de brotes de origen bacteriano, siendo *Salmonella spp.* El agente más frecuentemente aislado.

Además de lo anotado, probablemente exista aumento real en los brotes, reflejado en el incremento del serotipo Enteritidis, responsable en los últimos años, de la mayoría de aquéllos. Este serovar ha desplazado a *Salmonella Typhimurium* como causa más frecuente de infección esporádica o de brotes de enfermedad de origen alimentario. (Depto. Bacteriología y Virología, 2002)

#### **6.1.10 Fuentes de infección**

##### **Humanos**

Las heces de personas infectadas pueden contener un gran número de *Salmonella* y puede excretarlo hasta por 3 meses. De acuerdo al serovar implicado, el 1% de los adultos infectados y el 5% de los niños menores de 5 años pueden excretar el microorganismo por más de un año. La excreción de *Salmonella Typhimurium* en pacientes después de haber sufrido salmonelosis puede durar hasta 110 días.

##### **Animal**

*Salmonella* está presente en el intestino de pájaros, reptiles, tortugas, insectos (ocasionalmente), pollos, pavos, cerdo y puede infectar a los humanos por consumo de alimentos contaminados o contacto directo. El pollo y las reses son reconocidos como los principales reservorios de *Salmonella*. Muchas infecciones en animales pasan asintomáticas. Los animales pueden infectarse al recibir concentrados contaminados con *Salmonella*.

##### **Alimentos**

La carne de pollo y otros tipos de carne (res, pavo) provenientes de animales infectados son un importante vehículo de Salmonelosis, otros alimentos de origen animal como los huevos también son vehículo de transmisión. Recientemente, se ha asociado a alimentos

como frutas y vegetales como melones, mangos, tomates, espinacas, lechugas y semillas germinadas.

#### Medio ambiente

La *Salmonella* proveniente de las heces de animales puede permanecer en pastos y aguas, contaminando de esta manera otros animales, los insectos puede ser un vehículo de contaminación al posarse sobre las heces contaminadas y llevarlas a múltiples lugares. Este ciclo favorece la diseminación de *Salmonella*, llegando de esta manera al hombre.(Ministerio de protección social. INS, 2011)

#### **6.1.11 Rutas de transmisión**

*Salmonella* puede ser transmitida principalmente a los humanos por dos vías: Contacto directo e indirecto.

##### Directo

Por el consumo de alimentos contaminados. Se estima que el 90-95% de los casos de Salmonelosis están asociados al consumo de alimentos contaminados.

##### Indirecto

Al proceder del agua, del piso y de las más variadas especies de animales (roedores, moscas Y pájaros actúan como huéspedes reservorios los cuales no enferman).(Ministerio de protección social. INS, 2011)

#### **Ciclo de transmisión de *Salmonella spp.***

Como el reservorio de *Salmonella spp.* (Excepto *S. typhi* y *S. Paratyphi*) son los animales, todos los alimentos de origen animal pueden ser fuente de infección para las personas, además de las aguas contaminadas y los vegetales regados con éstas.

El ciclo de transmisión de *Salmonella spp.* Es una cadena que finalmente contamina a las personas. Las vías de transmisión son múltiples, entre las cuales la más importante se refiere a los alimentos de origen animal. En las plantas faenadoras de aves, bovinos y

cerdos, existe el peligro de contaminar la carne de estos animales con *Salmonella spp*, en las distintas secciones de la planta (recepción, sacrificio, evisceración, envasado), por contaminación cruzada.

Los animales a su vez son portadores de *Salmonella spp*, debido a factores tales como el consumo de pastos regados con aguas contaminadas por este microorganismo; las aves y animales silvestres pueden a través de sus heces contaminar los alimentos de uso animal, como lo son los concentrados de harina, los cuales pasan a ser importantes vehículos de transmisión de la bacteria a los animales domésticos de consumo humano.

Por otra parte, las personas portadoras de *Salmonella spp*, pueden transmitir la bacteria a otras personas al manipular los alimentos de manera inadecuada. Las personas también pueden adquirir la infección por contacto directo con los animales de compañía.

Otra fuente importante en la transmisión de *Salmonella spp*. Lo constituyen las aguas de cursos naturales, al ser contaminadas por aguas servidas, desechos de plantas faenadoras y otros.(Insunza & Soto, 1998)



## **6.2 Métodos para la detección de *Salmonella spp***

La detección de *Salmonella spp* en alimentos es de gran importancia para evitar la contaminación en animales o seres humanos. Existen métodos moleculares como el PCR en Tiempo Real, también otros basados mediante normas ISO 6579-2002, estos son denominados como métodos de referencia, y la mayoría de estos se basa en las características bioquímicas del microorganismo.

### **6.2.1 Métodos de detección tradicionales**

Hoy en día existen numerosas metodologías para el aislamiento y caracterización de *Salmonella spp.* a partir de alimentos, entre las que se pueden citar: APHA (2001), ISO 6785:2001 (IDF 93: 2001), ISO 6579 (2002), BAM-FDA (2011), USDA-FSIS MLG 4.05 (2011). Estos métodos tradicionales están basadas en pasos de pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo un enriquecimiento en medios líquidos selectivo, el aislamiento diferencial sobre medios sólidos, confirmación bioquímica de las colonias sospechosas y la confirmación serológica de colonias sospechosas. No cabe duda que estas metodologías son extremadamente confiables y es por ello que son consideradas Gold Standard. Sin embargo, los métodos tradicionales de detección de *Salmonella spp* en alimentos son lentos, laboriosos, requieren de mucho personal y necesitan un periodo de desarrollo de varios días.(Leotta & Dallos, 2013).

### **6.2.2 Método internacional estándar ISO 6579-2002**

En el análisis para el aislamiento e identificación de la bacteria *Salmonella*, se pueden mencionar habitualmente tres etapas fundamentales: pre-enriquecimiento en medio líquido no selectivo, enriquecimiento en medios líquidos selectivos, aislamiento diferencial sobre medios selectivos.

### **Pre-enriquecimiento en medio liquido no selectivo:**

En esta etapa se logra la revivificación de las *Salmonellas* lesionadas se incrementa su vitalidad y se adquieren las condiciones fisiológicas para un perfecto desarrollo, el medio de elección es el Agua Peptonada ya que mantiene un PH constante y así favorece el desarrollo de la *Salmonella*.

### **Enriquecimiento en medios líquidos Selectivos:**

En esta etapa de enriquecimiento selectivo, se estimula y favorece el crecimiento de la salmonella y restringe la proliferación de la flora competitiva.

En este estudio nosotros utilizamos el medio selectivo Caldo Rappaport-Vassiliadis, el medio está compuesto por triptona que es una fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento del microorganismo. Además el verde de malaquita inhibe el crecimiento de la flora competitiva, pero no el de *Salmonella*, los fosfatos monopotásico y dipotásico mantienen inalterable el valor del pH durante el almacenamiento del medio. La concentración de cloruro de magnesio es óptima para lograr un buen enriquecimiento de caldo y favorecer el desarrollo de salmonella. La recuperación de dicha bacteria en el medio Rappaport Vassiliadis se obtiene a 42°C

### **Aislamiento diferencial sobre medios solidos selectivos**

En esta etapa es donde aún más se restringe el crecimiento de la flora competitiva y se estimula el de la *Salmonella* por otra parte la composición de los distintos medios permite el crecimiento de colonias con aspecto característicos cada uno de ellas.

#### **Agar xilosa lisina Desoxicolato (XLD)**

Medio selectivo y de diferenciación. Contiene extracto de levadura como fuente de nutrientes y vitaminas. Utiliza el Desoxicolato de sodio como agente selectivo y por consiguiente, inhibe los microorganismos Gram positivos. La Xilosa se incorpora en el medio dado que la fermentan prácticamente todos los entéricos, excepto *Shigella*, y esta propiedad hace posible la diferenciación de dicha especie. La Lisina se incluye para permitir la diferenciación del grupo *Salmonella*.

### Agar Hektoen entérico

Este es un medio ideal para el aislamiento selectivo de *Salmonella* a partir de alimentos. El medio de cultivo contiene sales biliares que inhiben el desarrollo de la flora acompañante, y dos sistemas indicadores azul de bromotimol y fucsina ácida como indicadores de la fermentación de carbohidratos, citrato de hierro como un indicador de la formación de H<sub>2</sub>S a partir del tiosulfato. El medio de cultivo, permite una buena diferenciación de las colonias e inhibe el desarrollo de algunos coliformes y otras bacterias no fermentadoras de lactosa, facilitando así la identificación de *Salmonella*.

### Agar Bismuto Sulfito

La peptona, el extracto de carne y la dextrosa proporcionan los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos. El sulfato ferroso actúa como indicador en la producción de sulfuro de hidrógeno que se manifiesta en el centro de la colonia por un precipitado negro y un halo negro grisáceo con brillo metálico por la reducción de los iones bismuto en presencia del sulfuro de hidrógeno. El sulfito de bismuto y el verde brillante inhiben considerablemente el crecimiento de bacterias contaminantes.

## Medios de cultivo diferenciales

### Pruebas bioquímicas

La utilización de los medios de cultivo de detección para una detección final se basa, en evidenciar la presencia o ausencia de diferentes enzimas, que dirigen el metabolismo bacteriano a lo largo de diversas vías.

### Agar hierro tres azúcares o triple azúcares y hierro (TSI)

#### Fundamento:

Este medio se utiliza para determinar la capacidad de los bacilos gramnegativos para fermentar lactosa, sacarosa y glucosa, así como para determinar su capacidad de producir H<sub>2</sub>S (ácido sulfhídrico). El medio contiene dos cámaras de reacción, en la parte inclinada se fermenta la sacarosa y la lactosa y en la parte profunda se fermenta la glucosa. Se puede

fermentar los 3 carbohidratos o uno de ellos depende de la bacteria que se estudie. *Salmonella spp* es una bacteria lactosa negativa por lo que de esta reacción se obtendrá un resultado alcalina/ácido (K/A), por lo general *Salmonella* tiene la enzima tiosulfatasa, que reacciona con el tiosulfato de Na como una fuente de azufre para la producción del sulfuro de hidrógeno. Para que esto ocurra debe haber un pH ácido, lo cual se consigue con la fermentación de la glucosa. El primer paso es la fermentación de la glucosa, uno de cuyos productos terminales es el ácido fórmico. *Salmonella spp* tiene la enzima deshidrogenasa fórmica, el ácido fórmico es descompuesto en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>.

### **Lisina hierro agar (LIA)**

#### **Fundamento**

Es un medio para detectar enzimas que descarboxilan o desaminan la lisina en bacilos gramnegativos. Adicionalmente detecta enzimas que producen sulfuro de hidrógeno y gas proveniente de la glucosa.

#### **Prueba de descarboxilación de la Lisina:**

Si la bacteria posee la enzima descarboxilasa, la descarboxilación de la lisina produce cadaverina, un producto terminal alcalino que acentúa el color violeta del medio. Un requerimiento previo de la descarboxilación es un pH ácido, el cual se logra con la fermentación de la glucosa. Esta reacción se lleva a cabo en anaerobiosis, por lo que se observa en la parte profunda del medio. La desaminasa de la lisina actúa solo en ambiente de aerobiosis por lo que se verá en la parte inclinada.

La desaminación de la lisina termina en productos cetoácidos que en combinación con el Fe<sup>+</sup>, (proveniente del citrato de amonio férrico) hacen que la molécula combinada se observe de color rojo intenso. El indicador de pH no interviene en este caso. Por esta razón, la lectura de esta reacción no se abrevia con los símbolos de ácido (A) sino como R (rojo). No existen enterobacterias que posean las dos enzimas (descarboxilasa y desaminasa de la lisina) por lo que sólo se tiene que observar, o una de ambas reacciones o la ausencia de ambas.

Cuando no hay desaminasa ni descarboxilasa, en la parte inclinada se observará una alcalinización del medio por crecimiento y muerte bacteriana, la cual hará que esta parte se observe de color violeta (K) y en la parte profunda, acidificación por los productos terminales de la fermentación de la glucosa. En este caso, la parte profunda se observará de color amarillo (A). *Salmonella spp* posee la enzima lisina-descarboxilasa dando como resultado la reacción púrpura y fondo púrpura, (K/K) con producción de H<sub>2</sub>S y gas.

### **Movilidad, Indol, Ornitina (MIO)**

#### **Fundamento**

Es un medio que se utiliza para determinar la presencia de flagelos, así como las enzimas descarboxilasa de ornitina y triptofanasa. Por lo tanto, sirve para determinar la movilidad, descarboxilación de la ornitina y producción de indol.

#### **Movilidad**

Algunas bacterias poseen flagelos y otras carecen de ellos. Las bacterias móviles como *Salmonella spp*. Producirán un enturbiamiento homogéneo del medio debido a la distribución aleatoria de los microorganismos. Este medio ayuda a diferenciar las móviles de las no móviles.

#### **Producción de Indol**

Si la bacteria posee la enzima triptofanasa, el aminoácido triptófano será degradado en varios productos entre los cuales está el indol, el cual se hace visible al agregarle el reactivo de Kovac (p-dimetilaminobenzaldehído) o Erlich con un color rosado intenso. En el caso de *Salmonella spp* no hay presencia de la enzima y ausencia del indol, el reactivo se ve transparente.

#### **Descarboxilación de la Ornitina:**

Detecta la presencia de la enzima descarboxilasa de la ornitina, que de estar presente desdobla la ornitina en putrescina, un producto con pH alcalino, lo que hace intensificar el color violeta del medio.

### **Hidrolisis de Urea**

Detecta la presencia de la enzima ureasa. Cuando la bacteria tiene la enzima, la urea es desdoblada a amonio y CO<sub>2</sub>. El amonio alcaliniza el medio haciendo virar el indicador al rosado intenso, *Salmonella spp.* No tiene la capacidad de hidrolizar la urea, por lo tanto la prueba es negativa, siendo esta prueba importante para su identificación.

### **Aglutinación por antisuero polivalente Poli A-I & VI:**

Los ensayos serológicos se basan en el hecho de que los anticuerpos presentes en suero, que se producen en respuesta a la exposición a los antígenos de las bacterias, aglutinan las suspensiones bacterianas que contienen antígenos homólogos. El antisuero proporciona sólo una identificación serológica. Una identificación completa de un organismo se puede realizar sólo si se utiliza además un ensayo bioquímico

### **Métodos de detección molecular**

La invención de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por K. Mullis y sus colaboradores en 1985 ha revolucionado la biología molecular y la medicina molecular (Saiki et al., 1985). La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica in vitro utilizada para amplificar enzimáticamente una región determinada de ADN situada entre dos regiones de ADN cuya secuencia se conoce. Mientras que antes solo podían obtenerse cantidades mínimas de un gen específico, ahora incluso un único ejemplar de un gen puede amplificarse con la PCR hasta un millón de ejemplares en tan solo unas pocas horas. (Somma & Querci, 2010)

### **Base teórica**

El proceso que tiene lugar durante la PCR se puede resumir de la siguiente forma: partiendo de un DNA molde, una enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir de la zona de doble cadena originada por la unión de los cebadores al molde. Ahora bien, ¿cómo tiene lugar esta reacción? Como veremos a continuación los cambios de temperatura constituyen la base para que se completen los pasos necesarios. El proceso se lleva a cabo en tres fases: desnaturalización, hibridación y elongación

En primer lugar es necesario que el DNA se desnaturalice, es decir, que las dos cadenas de DNA se separen. Esta primera fase se conoce como desnaturalización y se lleva a cabo elevando la temperatura a alrededor de 94°C.

El siguiente paso consiste en un descenso de la temperatura para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde. Esta segunda fase se conoce como hibridación. Temperaturas habituales en esta fase oscilan entre 35 y 60°C

Por último, en la fase de elongación o extensión, la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura a la que se lleva a cabo esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; si se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación suele ser de 72°C.

En ciclo el primer ciclo de PCR únicamente se ha obtenido una copia de un pequeño fragmento del DNA molde. En este primer ciclo, los fragmentos generados no tienen el mismo tamaño: la copia de cada una de las cadenas se inicia, a partir del extremo 3', en el punto en el que el cebador hibrida con el DNA molde y termina en el momento en el que la enzima polimerasa no es capaz de añadir más nucleótidos (es decir, que la nueva cadena formada no tiene un tamaño definido).(Pérez, 2010)

### **6.2.3 PCR Convencional**

La Reacción en Cadena de la Polimerasa o PCR (siglas de su nombre en inglés Polymerase Chain Reaction) permite generar una gran cantidad de copias de un fragmento de DNA (ácido desoxirribonucleico). El requisito fundamental para poder llevar a cabo la reacción es disponer de fragmentos cortos de DNA de cadena sencilla complementarios a los extremos del fragmento a amplificar. Estos fragmentos servirán como cebadores para que una enzima polimerasa sea capaz de incorporar nucleótidos complementarios a la cadena molde. Una vez completada la reacción la cantidad fragmento amplificado se puede visualizar mediante técnicas sencillas de separación de fragmentos de ADN.(Pérez, 2010)

#### **6.2.4 PCR Tiempo Real.**

En la PCR tiempo real los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea si necesidad de realizar ninguna acción adicional, como elaboración de tinciones y visualización de geles, además mediante la detección de fluorescencia se puede medir durante la amplificación, la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado, esto permite evaluar y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

La PCR puede dividirse en tres fases: la de crecimiento lineal, la fase de crecimiento exponencial y la de finalización (plateau). La fluorescencia elevada se produce durante la fase de crecimiento exponencial temprana y el ciclo de PCR en el que se produce es denominado CT (curve threshold) o CP (Crossing Point). Este valor esté relacionado con el número de copias blanco que posea la muestra que se está evaluando, la cual permite que a través de la PCR se realice la cuantificación con un alta especificidad y sensibilidad.

Para llevar a cabo la PCR Tiempo Real los termocicladores incorporan un lector de fluorescencia que simultáneamente a la reacción indica a la pantalla la fluorescencia emitida por cada muestra elevada, de lo que permite saber en el momento real en que empieza la amplificación.

Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a Tiempo Real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas con fluorocromos diseñadas.

La fluorescencia emitida se debe a la acción de agentes intercalantes o marcadores de unión de ADN y sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los primeros son compuestos que se insertan entre las bases de una molécula de ADN, interrumpiendo la alineación y el emparejamiento de las bases de las cadenas complementarias (por ejemplo colorante de acridina, bromuro de etidio, SYBER Green). La emisión de la fluorescencia se da cuando



se une a ADN de cadena doble, de tal manera que cuanta mayor cantidad de producto genera la reacción de PCR, mayor cantidad de fluorescencia será emitida.

Los agentes intercalantes han sido ampliamente usados, pero tienen la desventaja de unirse a todo tipo de ADN de doble cadena incluyendo dímeros (si los hay), o a productos inespecíficos (si los hay), pueden generar resultados falsos positivos al momento de realizar la identificación de un gen o segmento específico de ADN, de la misma forma, con este tipo de fluorocromos no se puede usar PCR multiplex ya que no diferencia entre un amplicon y otro, esto implica que cuando se usa SYBER Green, se debe tener condiciones de PCR óptimas y diseños de primers exactos que eviten la formación de dímeros, es recomendable iniciar la síntesis de ADN a temperaturas elevadas lo cual disminuye la formación de inespecificidades, para ello se usan las sondas Taq polimerasa modificadas, que se activan a altas temperaturas, o anticuerpos que evitan la acción de la polimerasa a temperaturas inferiores de 97°C.

Los agentes intercalantes no permiten la identificación de los polimorfismos en la secuencia de la amplificación, es decir son ensayos de detección independientes a la secuencia.

Los ensayos en los que se analiza secuencias específicas mediante PCR en Tiempo Real usan sondas marcadas con fluorocromos y estas pueden ser simples de hibridación o hidrólisis.

Sondas simples: Corresponden al tipo más sencillo de sonda diseñada para la detección de mutaciones y polimorfismo de nucleótido simple (SNP). Se usan sondas marcadas con un fluorocromo en el extremo 3' o 5', que se hibridan específicamente a la secuencia que contiene SNP de interés. Fluorescencia es mayor en aquellas muestras en que la sonda de hibridación, lo que permite identificar normales, homocigotos o heterocigotos para SNP particular.

El análisis de SPN se realiza monitorizando el comportamiento de la curva, de melting de los híbridos sonda blanco a un incremento en la temperatura así cuando el apareamiento es perfecto, las temperaturas son mayores y ante la presencia de un SPN disminuye.

Sondas de hibridación: varias sondas de secuencias específicas se usa el principio de transferencia de energía de resonancia fluorescente (**FRET**) que está basado en la transferencia de energía de una molécula fluorescente adyacente, las cuales constituyen el donador y el aceptor. Estas pueden ser utilizadas según los métodos de 3 o 4 oligonucleótidos.

El método de 4 oligonucleótidos consiste en dos pares de primers y dos sondas con secuencias específicas que están unidos de manera adyacente una a la otra. La 3<sup>n</sup> una formación de cabeza-cola la sonda upstream está marcado con un fluorocromo aceptor en el extremo 3' y la sonda downstream posee un fluorocromo aceptor en el extremo 3' y en el extremo 5', así estos extremos sufren un incremento en la transferencia de energía de resonancia fluorescente (**FRET**) cuando se usan estas para el análisis de dosis genética, la cuantificación se realiza efectuando evaluando la cantidad de fluorescencia emitida, la cual es directamente proporcional la cantidad de blanco de ADN generado durante PCR en el análisis de SNP se analizan curvas de Melting MA que un mal apareamiento simple entre las sondas de hibridación y el blanco, dado para la presencia de polimorfismo disminuye la temperatura melting la cual es fácilmente detectada en las curvas correspondientes. Se observan dos fluorocromos con diferente emisión de fluorescencia y esto se logra cuando el donador y aceptor se encuentran muy cercas.

Las Sondas de hidrolisis emiten fluorescencia cuando la actividad exonuclear 3'-5' de la taq polimerasa las separa del blanco, esos ensayos han sido convencionalmente llamados "Taq man" o ensayos de nucleos 5' estas sondas simples contiene un reportero y un quencher de fluorescencia, durante la PCR, la actividad nucleosa 5' de la polimerasa elimina la sonda, separando el reportero del quencher, momento en el que se da la emisión de la fluoresceína.

Los productos del PCR que se acumulan son detectado directamente midiendo, la intensidad de la fluorescencia dado que esta solo se produce si la sonda se hibrida, una ausencia de señal indicaría que la región complementaria a la sonda diseñada no está en el blanco de amplificación.

Cuantificación mediante PCR en Tiempo Real es una de las aplicaciones más importante de la PCR en tiempo real es la cuantificación de la dosis genética que permite la evaluación de lesiones y amplificaciones de sus genes específicos y la cuantificación de expresión genética.

La cuantificación por PCR en Tiempo Real se ha realizado de manera absoluta o relativa.

Cuantificación absoluta: usa estándares de concentración conocida han sido diluidos de tal manera que se generan curvas estándares, estas curvas producen relaciones lineales entre CT o CP y aplicando la ecuación de la recta, el uso de este método asume que la eficacia de amplificación es la misma para todas las muestras.

Cuantificación relativa: durante la cuantificación relativa los cambios en la expresión del gen o genes de interés que están siendo evaluados son medidos tomando como la base la expresión de un control externo o una muestra de referencia llamada calibrador. se han descrito diversos protocolos al aplicar en la cuantificación relativa, como el método de curva o estándar, método comparativo delta (Ct) modelo pafaffi.

### **Ventajas del PCR Tiempo Real**

La principal ventaja del PCR tiempo real son la rapidez y la sensibilidad, debido a que obvia procesos adicionales de detección. El uso de sistemas cerrados disminuye el riesgo de contaminación. Los sistemas de PCR tiempo real permite cuantificar la concentración inicial del ADN presente en las muestras con mayor sensibilidad en relación con los procesos de PCR convencional.

En cuantificación de expresión genética el PCR en Tiempo Real permite dar resultados entre 1000 y 1, 000,000 veces más sensibles que los ensayos de protección con ADNasas, es 1,000 veces más sensibles que la hibridación dotblot reversa y puede detectar una copia simple de un transcrito. Adicionalmente esta metodología puede detectar diferencias en la expresión genética en orden del 23%.

Las desventajas de utilizar PCR tiempo real son el costo de reactivos para su elaboración y la necesidad de diseños experimentados más estrictos ante la gran sensibilidad que ofrece la técnica.(Fonseca Mendoza & Mateus Arbelaez, 2010)

## VII. DISEÑO METODOLÓGICO

**Área de estudio:** Mercado Iván Montenegro, ubicado en el departamento de Managua

**Tipo de estudio:** Descriptivo de Corte Transversal.

Se realizó un estudio de tipo descriptivo de corte trasversal con el propósito de analizar la comparación del método convencional ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de *Salmonella spp* en carne molida, CNDR-MINSA, Noviembre-Diciembre 2014.

**Universo:** Lo constituyeron los 39 tramos distribuidores de carne del Mercado Iván Montenegro. Cada tramo represento un lote, cada lote represento 5 muestras de 1 Libra de carne molida de dicho tramo.

**Muestra:**La muestra estuvo conformado por 5 lotes que corresponden al 12.8% del universo. Cada lote representa 5 muestras de 1 Libra de carne molida de dicho tramo. Siendo un total de 25 muestras que se analizaran para el análisis de la comparación de *Salmonella spp* con una proporción esperada de 5%, un nivel de confianza de 0.95%.

**Tipo de muestreo:** No probabilístico por conveniencia. Utilizando una n=5 según la Norma técnica obligatoria Nicaragüense NTON 03-080-08.

### **Criterios de inclusión:**

1. Carne molida artesanal
2. Que los productos sean distribuidos en el mercado en estudio.
3. Que no sean productos empacados

### **Técnicas e instrumentos**

Para la obtención de la muestra nos dirigimos al mercado en estudio, se procedió a seleccionar los tramos que consideramos potencialmente susceptibles por su ubicación, condiciones higiénicas e infraestructura. Se adquirió las muestras de carne molida por compra y solicitamos su debido pesaje.

Con el objetivo de recopilar datos utilizamos una ficha de recolección de datos la cual fue llenada con información acerca de procedencia, mercado distribuidor, aspectos de la muestra entre otras

Las muestras fueron procesadas en el departamento de Aguas y Alimentos del CNDR-MINSA donde se realizó para las muestras sospechosas el método convencional de aislamiento 6579-2002 y la PCR Tiempo Real con sus dos variantes de investigación a partir de APB y Caldo Rappaport Vassiliadis.

Los equipos utilizados fueron: Balanza analítica, Campana de seguridad tipo I labconco Model 6433, Thermo incubadora scientific model 3221, balanza Metter Toledo, centrifuga 5424 – Eppendenfort, Thermomixer confort – Eppendenfort. , Stomacher 400 circulator, StepOne Plus Applied Biosystems.

### **Limitaciones de estudio**

En nuestro estudio una de las mayores limitaciones definitivamente fue el tiempo, motivo por el cual se nos fue imposible analizar mayor cantidad de muestras

### **Análisis de la información**

Se realizó una comparación entre el método convencional y el método PCR en Tiempo Real como prueba de tamizaje , los estudios estadísticos fueron calculado por medio del software Epidat 3.5.1 tomando en cuenta parámetros tales como: Sensibilidad y Valor Predictivo Positivo.

### **Redacción de la información**

El análisis estadístico se utilizó en base estadística descriptiva y tablas de contingencia. Para la elaboración del documento y realización de la tablas empleamos se utilizaron los programas Microsoft office Word, Microsoft office Excel y Microsoft office PowerPoint para elaborar la presentación de la defensa.

### **Consideraciones éticas**

Para realizar nuestro estudio en el área de Aguas y alimentos nos dirigimos al Dr. Ángel Balmaceda director del CNDR-MINSA con una carta y protocolo que mostraba el tema y objetivos de nuestro estudio, puesto que necesitábamos su autorización para poder ingresar al centro y hacer uso de dicha área.

Con el permiso concedido acudimos donde la Msc. Carmen Lanuza Jefa del departamento de Aguas y Alimentos de igual manera, con una carta y el protocolo del estudio con el fin de que nos brindara su permiso para el procesamiento en esta área de las muestras en estudio.

## **Procedimiento de:**

### **7.1 Aislamiento de *Salmonella spp* según ISO 6579 – 2002**

Pre-enriquecimiento no selectivo

- Pesar 25 gr de la muestra en una bolsa Stomacher
- Adicionar 225 ml de APB (Agua peptonada bufferada)
- Incubar a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$  por  $18 \pm 2$  horas.

Enriquecimiento selectivo

Agitar la bolsa con el medio de pre-enriquecimiento (APB) y transferir 0.1 ml a un tubo que contenga 10 ml de Rappaport- Vassiliadis e incubar a  $41.5 \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 3\text{h}$ .

Aislamiento

Mezclar y agitar el tubo de Rappaport Vassiliadis y transferir con una asa de 3 mm un inóculo a los medios selectivos de enriquecimiento XLD (Xilosa, Lisina, Desoxicolato), HE (Hektoen Entérico) y SB (Sulfito Bismuto) incubar a  $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$  por  $24 \pm 3\text{h}$ .

Luego del tiempo establecido examinar dichas placas en busca de colonias características de *Salmonella spp* con forme al medio utilizado

Colonias crecidas en:

**XLD** (Xilosa, Lisina, Desoxicolato): Estas colonias se observan de color rojo con centros negros debido a un cambio de pH por fermentación de xilosa y descarboxilación de la lisina

**Agar HE** (Hektoen Entérico): Estas colonias son verdes azuladas con o sin centro negro.

**SB**(Sulfito Bismuto): Las colonias crecidas en Agar SB con SH2 positiva muestran un centro negro rodeado por un borde claro y de igual manera bordeado por un precipitado negro con brillo metálico por la reducción de iones de bismuto que se transforman en bismuto metálico a veces las colonias son marones grises o verdes.



## Pruebas bioquímicas

Seleccionar 3 colonias típicas de *Salmonella spp.* De las placas de Agar he inocular en las siguientes pruebas bioquímicas:

**TSI** (Agar triple azúcar hierro): Tomar suavemente una porción del centro de la colonia con asa bacteriológica recta y estéril e inocular por picadura y estría con un movimiento en forma de S en la superficie del medio. Incubar a  $36 \pm 2$  °C a  $24 \pm 3$ h.

### Reacción:

- Rojo/ amarillo
- Ácida (amarillo) en el fondo
- Con producción de  $H_2S$  (ennegrecimiento del medio) y gas (burbujas de aire)

**LIA** (Agar lisina hierro): El medio debe ser inoculado con la misma UFC que se sembró en TSI, realizar tres punciones sin tocar el fondo del tubo de tal forma que se hagan los vértices de un triángulo imaginario y estriar en la superficie con un movimiento en forma de S. Incubar a  $36 \pm 2$  °C a  $24 \pm 3$ h

### Reacción:

- Violeta/violeta
- Producción de  $SH_2$  (ennegrecimiento del medio)
- Poca producción de gas

**Hidrólisis de la Urea:** Con un asa recta estriar la superficie del medio con un movimiento en forma S a medida que retire el asa del tubo.

### Reacción:

- Color sin cambio

**MIO** (Movilidad, Indol y Ornitina) el asa recta debe introducirse hasta la mitad del medio de esta manera se deposita la muestra correctamente.

Reacción:

- Movilidad: positiva, turbidez difusa en el medio.
- Indol: negativo, ausencia del anillo rojo en la superficie del medio al adicionar el
- Ornitina: positiva, viraje de color.

### **Aglutinación por antisuero polivalente Poli A-I & VI**

A partir de resultados característicos para *Salmonella spp* de las pruebas bioquímicas realizar serotipificación a partir de caracterización de los antígenos somáticos O en lámina:

- Sobre una lámina poner una gota de solución salina al 2%
- Con un palillo, tomar un inóculo de la cepa, mezclar homogenizando bien y cuidadosamente.
- Mover o rotar la lámina manualmente y en forma circular un minuto.
- Observar la presencia o ausencia de aglutinación.

Resultados: Si no hay aglutinación realizar la aglutinación con antisuero polivalente.

Si hay formación de grumos, se debe verificar la bioquímica de la cepa.

## 7.2 Extracción del ADN Bacteriano

### a. InstaGene™ Matrix

1. Seleccionar dos tubos de microcentrifuga y dispensar en cada uno de ellos 1 ml del pre – enriquecimiento en APB, enriquecimiento en Rappaport Vassiliadis respectivamente.
2. Centrifugar durante 5 minutos a 12,000 rpm.
3. Descartar el sobrenadante. Añadir 200 µL de InstaGene™ Matrix al sedimento e incubar durante 10 minutos, con una velocidad moderada de 1400 rpm.
4. Mezclar con un vortex durante 10 segundos.
5. Incubar el tubo a temperatura de 100 ° C durante 10 minutos.
6. Dejar atemperar.
7. Centrifugar a 12.000 rpm durante 3 minutos.
8. Extraer el sobrenadante a un vial limpio, debidamente marcado y almacenar el sobrenadante a -20 ° C para la realización del PCR

### b. NaOH- Tris/HCl

1. Seleccionar dos tubos de microcentrifuga y dispensar en cada uno de ellos 1 ml del pre – enriquecimiento en APB, enriquecimiento en Rappaport Vassiliadis.
2. Centrifugar la muestra durante 5 minutos a 1200 rpm.
3. Desechar el sobrenadante.
4. Añadir 100 µl de NaOH 25 mmol, dejar reposar por 10 min.
5. Incubar a temperatura de 99 °C por 10 minutos.
6. Centrifugar 5 minutos a 1200 rpm
7. Agregar 100 ul tris/hcl 80 mmol y mezclar.

8. Centrifugar a 1200 rpm por 3 min
9. Extraer el sobrenadante y almacenar a temperatura de -20 ° C.

### 7.3 PCR en Tiempo Real

**El PCR en Tiempo Real** se realizó siguiendo las recomendaciones de los autores con unas pequeñas variantes, se usó el equipo StepOne Plus de Applied Biosystems con un volumen total (mezcla de reacción) de 10 µl. Los parámetros de termociclado fueron 5 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95° C y 1 minuto a 90 °C, la sonda ttr-5 fueron leídas por el canal FAM (530 nm), el control interno fue leído en el canal VIC (554 nm), debido a que el laboratorio no cuenta con la capacidad para crear un fragmento de ADN artificial que sirva como control interno se usó un control interno TaqMan® Exogenous Internal Positive Control Reagents VIC Probe de la casa comercial Applied Biosystems. (New medical., 2014)

**Tabla 3.** Reactivos para la detección de gen ttr-5

Reactivo	Concentración
<b>TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2x) (Applied Biosystems)</b>	1X
<b>10XExo IPC Mix (Applied Biosystems)</b>	1X
<b>50XExo IPC DNA (Applied Biosystems)</b>	1X
<b>Primer ttr-6 (forward)</b> <b>CTCACCAGGAGATTACAACATGG</b>	0.4 µM
<b>Primer ttr-4 (REVERSE)</b> <b>AGCTCAGACCAAAAGTGACCATC</b>	0.4 µM
<b>Sonda (ttr-5)</b> <b>FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTT</b> <b>DarkQuencher</b>	0.25 M

## VIII. OPERACIONALIZACION DE VARIABLE

Variable	Subvariable	Indicador	Valores	Criterios
Método Convencional para el aislamiento de <i>Salmonella</i> spp. ISO-6579-2002.	Aislamiento de <i>Salmonella</i> spp	XLD	Colonias color rojo con centro negro	Crecimiento característico de UFC No hubo crecimiento bacteriano
		Sulfito Bismuto	Colonias marrones o negras en ocasiones con brillo metálico	Crecimiento característico de UFC No hubo crecimiento bacteriano
		Hektoen	Colonias verde azuladas	Crecimiento característico de UFC No hubo crecimiento bacteriano
	Pruebas Bioquímicas	TSI	Parte inclinada: Fermentación de Lactosa y Sacarosa/ Parte Profunda: Fermentación de Glucosa*	A/AG
			Parte inclinada: No hay fermentación de Lactosa ni Sacarosa/ Parte Profunda: No hay fermentación de Glucosa	K/K
			Parte inclinada: No hay fermentación de Lactosa ni Sacarosa/ Parte Profunda: Fermentación de Glucosa con producción de gas y sulfuro de hidrogeno*	A/KG+
		LIA	Parte inclinada: No hay desaminación de la Lisina/ Parte Profunda: Descarboxilación de la Lisina Positiva mas poco gas	K/Kg
			Parte inclinada: No hay desaminación de la Lisina/ Parte Profunda:	K/A

	Prueba serológica		No hay descarboxilación de la Lisina ni gas y H <sub>2</sub> S <u>Parte inclinada:</u> Desaminación de la Lisina positiva / <u>Parte Profunda:</u> No hay descarboxilación de la Lisina Se produjo poco gas y H <sub>2</sub> S	R/Ag+
		UREA	Urea Negativa Urea Positiva	No hay viraje de color viraje de color
		MIO	Movilidad	Turbidez Positiva No hay turbidez Negativa
			Indol (Agregar gotas de Kovac)	Positivo (anillo rosado) Negativo (Transparente)
			Ornitina	Positivo (No vira de color) Negativo (Intensifica el color violeta)
		Poli A-I & V I	Aglutinación No hay aglutinación	Positivo Negativo
PCR en Tiempo Real	Método de extracción InstaGene™ Matrix	Extracción y amplificación de un fragmento de ADN específico de <i>Salmonella spp</i>	Curva de amplificación eficiente ΔRN mayor 0.1	Positivo
	Método de extracción con Hidróxido de Sodio		No amplificación	Negativo
Parámetros estadísticos	Sensibilidad	<i>Salmonella spp.</i>	Verdaderos Positivos	Verdaderos Positivos /Verdaderos Positivos + Falsos Negativos
	VPP		Valor predictivo positivo	Verdaderos Positivos /Verdaderos Positivos +Falsos Positivos
Factores	Tiempo	Horas Días	≤ 48 horas De 48 horas a 5 días ≥ 5 días	Mayor tiempo Menor tiempo
	Costo	Costos directos de material \$	Medios de cultivo Reactivos Equipos	Alto Bajo

## IX. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

*Salmonella spp* es uno de los patógenos más significativos causantes de brotes y enfermedades transmitidas por alimentos entre estos se encuentran las carnes molidas. Es por tal razón que nos propusimos el objetivo de comparar *Salmonella spp* en esta matriz por métodos convencionales y moleculares.

Se estudiaron 25 muestras de carne molida (5 lotes) las que resultaron 100% positivas por ambos métodos (Ver Tabla 1). El aislamiento de *Salmonella spp* fue según la norma ISO-6579-2002. La detección se efectuó por PCR-Tiempo Real Sondas TaqMan para *Salmonella*, todo esto a partir de los caldos APB (Agua Peptonada Bufferada) y Rappaport Vassiliadis para determinar si ambos son igualmente Sensible para detectar la presencia del genoma bacteriano de *Salmonella spp*. (Ver Gráfico 1).

**Tabla 1.** Aislamiento y detección de *Salmonella spp* en carnes molidas

Técnica	Medios y métodos de extracción	Total de muestras positivas	Total de muestras negativas	Total de muestras analizadas por método
<b>Metodo de aislamiento ISO 6579-2002</b>	XLD	16	9	25
	SB	25	0	
	HK	10	15	
<b>PCR Tiempo Real</b>	IntaGene APB	21	4	25
	NaOH APB	17	8	
	IntaGene Rappaport Vassiliadis	25	0	
	NaOH Rappaport Vassiliadis	24	1	

Fuente: Resultados de laboratorio

Para el aislamiento de *Salmonella spp* de las 25 muestras de carne molida. Se implementó un control de calidad que nos garantizó, la correcta identificación de *Salmonella spp* en los agares utilizados: *Salmonella Typhimurium* ATCC 14028 como control positivo y

*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 como control negativo. Se aplicó el método ecométrico a los medios para calcular la productividad y selectividad resultando satisfactorios. El medio sólido selectivo Sulfito Bismuto resultó ser el que se aisló 100% de las *Salmonellas spp* investigadas, seguido por XLD y Hektoen. A todas las cepas sospechosas se les aplicó las pruebas bioquímicas estipuladas por la ISO-6579-2002 y confirmadas con la serología por aglutinación con antisuero polivalente Poli A-I & VI resultando positivas en 100% por ambas pruebas antes mencionadas.

En la detección del microorganismo se utilizó de igual manera un control positivo Taq man Exogenous Internal de la casa comercial y un control negativo (agua). El método en general resultó ser satisfactorio, pero InstaGene a partir del caldo Rappaport obtuvo un mayor porcentaje de cepas aisladas. La baja sensibilidad de la PCR en Tiempo Real en APB, quizás fue debido a los inhibidores propios del medio como son las sales biliares y a la contaminación por arrastre de productos no específicos recordándonos que este no es un medio selectivo. Lo contrario al caldo de enriquecimiento selectivo Rappaport-Vassiliadis que potencializa el crecimiento de *Salmonella spp* al aportar nutrientes y evitar que la bacteria se estrese además de inhibir el crecimiento de microorganismos que la fastidien y se conviertan en interferentes al momento de la lectura.

De acuerdo con las Normas Técnicas Obligatorias Nicaragüenses los productos cárnicos no deben tener presencia de *Salmonella spp* por lo que basados en los resultados de la presente investigación consideramos que este producto no es apto para el consumo. Esta contaminación podría deberse al alto grado de manipulación de la carne molida y a las malas condiciones en el expendio, uso del transporte y alteración de la cadena de frío utilizado por los distribuidores. Causas que si bien es cierto no forma parte de los objetivos del estudio no podríamos dejar pasar desapercibidos.

Al comparar los resultados obtenidos del método convencional con los realizados por Yáñez E et al., 2008. Córdoba, Colombia, en la que aisló un 15.6% (5/32) de *Salmonella spp* de las muestras investigadas y Hernández S et al., 2007. México con un 11%. Observamos la diferencia en lo que se refiere al aislamiento y nos hace remarcar la



importancia de generar productos inocuos aumentando las posibilidades de comercializar con un mejor margen de certeza sobre la calidad sanitaria, lo que se traduciría en un mayor grado de confianza por parte de los consumidores hacia el producto que adquieren, mejorando el impacto socioeconómico de los nicaragüenses en gastos para salud.

**Tabla 2.** Porcentaje de eficacia de los métodos de extracción de ADN bacteriano. A partir del caldo de enriquecimiento no Selectivo APB y Caldo de enriquecimiento Selectivo Rappaport Vassiliadis.

Método de extracción	Sensibilidad	Valor predictivo positivo
<b>InstaGene™ Matrix-APB</b>	84%	100%
<b>NaOH- Tris/HCl-APB</b>	68%	100%
<b>InstaGene™ Matrix Rappaport</b>	100%	100%
<b>NaOH- Tris/HCl Rappaport</b>	96%	100%

*Fuente: Resultados de laboratorio*

En relación a la extracción. Se utilizaron dos caldos donde se aplicó dos tipos de extracción, esto debido que deseábamos conocer cuál de los métodos de extracción era el más conveniente para obtener mejores resultados al momento de la lectura por PCR Tiempo Real y obtener resultados en menor tiempo.

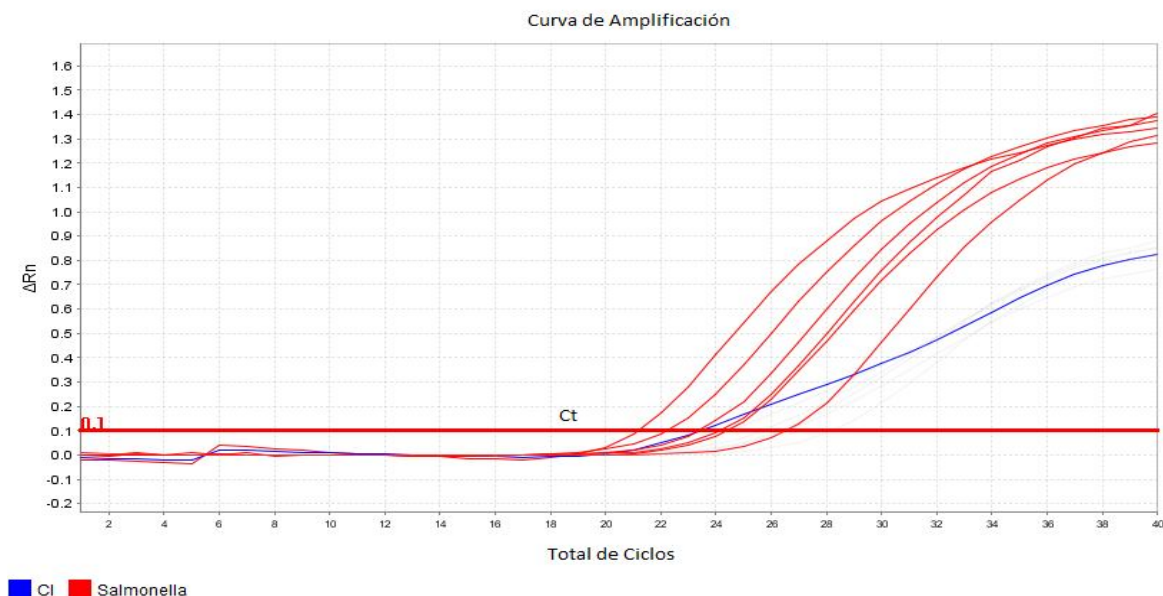
IntanGene Matrix-APB obtuvo un 84% e IntanGene Matrix-Rappaport Vassiliadis obtuvo un 100% de Sensibilidad en comparación con NaOH-APB que obtuvo un 68% y NaOH-Rappaport Vassiliadis 96%, el valor predictivo de los cuatro métodos fue de 100%. Lo que nos demuestra que el caldo Rappaport Vassiliadis sigue siendo el caldo ideal para la recuperación del ADN de *Salmonellas spp*, no presentando inhibidores en la extracción. Resultando por tanto el IntanGene Matrix el método de extracción ideal para la detección de *Salmonella spp* por la PCR Tiempo Real. **Tabla 2**

Referente a la ausencia de parámetros como la Especificidad y Valor Predictivo Negativo no se lograron calcular debido a los hallazgos encontrados en los resultados expuestos anteriormente ya que no se obtuvieron muestras negativas. Por tanto cuando se usaron las tablas de contingencias 2x2 se pudo observar la falta de los datos Negativos.

En la actualidad se considera que el método convencional de aislamiento es la técnica Gold estándar para la detección de *Salmonella spp.* En el estudio investigativo de M. Johnson y P Brzoska et al en 2010, Uso de la PCR en Tiempo Real para la detección de patógenos aseguran que el PCR tiempo real es mucho más sensible que el método por aislamiento lo que al comparar con los resultados de nuestro estudio encontramos que difieren en gran manera ya que ambos métodos demostraron igual sensibilidad, considerándose así tanto al PCR Tiempo Real como al método por aislamiento pruebas valiosas e igualmente sensibles para el tamizaje de esta bacteria.

El ensayos de PCR en Tiempo Real desarrollado por Josefsen *et al*, 2007 para la detección de *Salmonella spp* en 12 horas en muestras de carne, se incluyeron 8 horas de preenriquecimiento, seguida de una extracción automática de ADN y amplificación de esta. Evaluaron diferentes alternativas de medios nutritivos como el Agua Peptonada, caldo BHI y Tripticasa de Soya, estudiándose el efecto de agentes que promuevan el crecimiento como el piruvato de sodio, la yema de huevo y el efecto de agentes selectivos como la Novobiocina, verde brillante etc., no encontrándose diferencias significativas en ninguno de los ensayos aplicados. Siendo diferente a lo encontrado en nuestra investigación en lo que se refiere al uso de caldos de enriquecimiento.

**Gráfico 1.** Positividad de muestras de carne molida durante su análisis por PCR-TR



Fuente: Resultados de laboratorio

- Tabla 3.** Diferencias entre parámetros estadísticos (Sensibilidad y Valor Predictivos Positivo), factores de costo y tiempo en la utilización del método estándar y el PCR Tiempo Real para la determinación de *Salmonella spp* en cárnico.

Método	Total de muestras positivas	Total de negativas	Sensibilidad	Valor predictivo positivo	Costo Total \$	Tiempo de realización
<b>Estándar ISO 6579</b>	25	0	100%	100%	3.04	5 ± 1 día
<b>PCR Tiempo Real</b>	25	0	100%	100%	16.45	48 ± 3 hrs

Fuente: Resultados de laboratorio

En la **Tabla 3.** Se muestran los valores de sensibilidad, valor predictivo positivo, costo y tiempo de realización pertenecientes al estudio de 25 muestras de carne molida referentes a

los 5 lotes analizados por método estándar y molecular para la determinación de *Salmonella spp.* Resultando un 100% para Sensibilidad y Valor Predictivo Positivo.

El valor monetario es otro factor que hace más viable la utilización de PCR Tiempo Real aun cuando la compra del equipo y materiales implica mayor cantidad de dinero si se realiza una valoración del total de costos en comparación al método convencional resulta ser más modesto tomando en cuenta las posibilidades de un re aislamiento y repetición de pruebas con el propósito de confirmación. (Ver tabla 3)

El Tiempo cómo se sabe es una de los parámetros importante en el departamento de Agua y Alimento debido a la respuesta que se tiene que dar a los conflictos alimenticios así como también a la empresa privada ya que de estos resultados depende muchas veces la exportación de nuestros productos a otros países debido a libre trata de comercio. Por lo que se hace indispensable dar respuesta inmediata a todos los alimentos que entran al a la dirección de Regulación de Alimento del Conchita Palacios. La PCR en Tiempo Real ofrece resultados en un tiempo mucho más breve que los ensayos de cultivo que se toman a veces 5 días, aumentando así el número de muestras analizadas y el aprovechamiento del tiempo en esta área.

## X. CONCLUSIÓN

En este estudio se analizaron un total de 25 muestras de carne molida por medio de los métodos estándar internacional ISO 6579:2002 y PCR Tiempo Real obteniendo un 100% de positividad para el aislamiento y la detección de *Salmonella spp.*

En la utilización de los métodos de extracción. El InstaGene Matrix resulto ser el ideal para la extracción del ADN bacteriano de *Salmonella spp* para su posterior detección por la PCR Tiempo Real, presentando un 100% (25 muestras positivas) de Sensibilidad a partir del caldo Rappaport Vassiliadis en comparación con el Hidróxido de sodio que obtuvo un 96% (24 muestras positivas) de Sensibilidad.

La Técnica de PCR Tiempo Real obtuvo los mismos valores de Sensibilidad y Valor Predictivo Positivo con un 100%. Lo que demuestra que la PCR-Tiempo Real es una valiosa prueba alternativa en el tamizaje para la detección de *Salmonella spp*, en cárnicos. Además de disminuir el tiempos de diagnóstico.

## **XI.RECOMENDACIONES**

Al departamento de agua y alimentos del CNDR

Utilizar la técnica molecular de PCR en Tiempo Real como prueba de tamizaje para la detección de *Salmonella spp*, en Cárnicos.

MINSA

Implementar programas eficientes de vigilancia de *Salmonella spp*, realizando supervisiones constantes a los expendios en relación al cumplimiento de las Normas Técnicas Obligatorias Nicaragüenses

Realizar estudios consecutivos para detectar *Salmonella spp*, en carne molida en los diferentes mercados del país, para conocer su prevalencia

A los comerciantes

Poner en práctica las medidas higiénicas sanitarias necesarias en los expendios para la reducción del riesgo de contaminación.

A los distribuidores

Cumplir con medidas higiénicas en la manipulación y procesamiento de las carnes para evitar contaminación cruzada con dicho microorganismo de interés evitando así la infección en el consumidor.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUILAR A, D. (2011). *Etapas de importancia en la contaminación por Salmonella de las canales de pollo*.
- Chien Wu, H. (2012). *Compendio de Microbiología Médica. Facultad de ciencias médicas y salud*.
- Depto. Bacteriología y Virología. (2002). *Salmonella spp*. Obtenido de <http://www.bvsops.org.uy/pdf/salmonella.pdf>.
- Dr. Romero, C. (2007). *Microbiología Y parasitología Humana: bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias*. México.
- Figueroa Ochoa, I. M., & Verudugo Rodríguez, A. (2005). Mecanismos moleculares de Patogenicidad de Salmonella spp. *Revista Latinoamerican De Microbiologia*.
- Fonseca Mendoza, D., & Mateus Arbelaez, H. (2010). *Prácticas de laboratorio de biología molecular: su aplicación en genética básica*.
- Gillespie, C. (2 de Diciembre de 2012). *Boletín de Intoxicación Alimentaria*. Obtenido de Brote de salmonelosis en Illinois enferma. E.E.U.U: <http://foodpoisoningbulletin.com/tag/mcdonalds-salmonella>
- Gutiérrez, G. (2009). Artículo Enfermedades transmitidas por alimentos y su impacto socioeconómico.
- Insunza, M., & Soto, A. (1998). salmonelosis: una enfermedad que se transmite por alimentos. *Revista Tecno Vet, FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS*.
- Jurado, J., Arenas, M., Doblas, D., Rivero, A., & Torre, C. (2010). *Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas*.
- Leotta, G., & Dallos, A. (2013). *Detección de Salmonella spp. 3M Food Safety*.
- López Cruz, S., Calderón, V., Matute, J., Videa, T., Baltodano, A., & Ávila, J. (2004). *Manual de procedimientos de bacteriología médica*. Managua, Nicaragua.
- Mejía, W. J. (2003). *Epidemiología de la salmonelosis porcina de granja de Cataluña y determinación de los factores de riesgo de la infección*. Barcelona.

- Méndez, I., Badillo, A., Ortiz Parra, G., & Faccini, Á. (2010). *Caracterización microbiológica de Salmonella en alimentos de venta callejera en un sector universitario de Bogotá, Colombia*. Bogotá, Colombia.
- Mercola, D. (Febrero de 2013). *MERCOLA*. Obtenido de Carne de Hamburguesas Hecha de Carne de Caballo y Brote de Salmonella por la Carne Molida—La Desagradable Verdad del Fraude y Contaminación en los Alimentos:  
<http://espanol.mercola.com/boletin-de-salud/hamburguesas-de-carne-de-caballo.aspx>
- Ministerio de protección social. INS. (2011). *Perfil de riesgo Salmonella spp. (No tifoideas) en pollo entero y en piezas*. Colombia: Imprenta nacional de Colombia.
- Ministerio de salud. (2011). *Análisis microbiológico de los alimentos. Metodología analítica oficial. ANMAT federal*.
- Murray, P. R., & Rosenthal K., S. (2009). *Microbiologia medica*.
- New medical*. (septiembre de 2014). Obtenido de Historia de salmonella. EEUU:  
<http://www.news-medical.net>
- Norma Internacional 6579 ISO 2002. (2002). *Internacional Estándar. Microbiology of food and animal feeding stuff- horizontal method for the detection of Salmonella*.
- OMS. (2007). *Nota de Información INFOSAN No. 6/2005 - WHO Global Salm-Surv*.
- Pérez, C. (2010). *Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR)*. Universidad politécnica de Valencia.
- Romero Caballero, R., & Herrera Benavente, I. F. (2002). *Síndrome diarreico infeccioso*. Médica Panamericana.
- Rubio, M., Martínez, J., & Hernández, R. (2013). Detección de *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Yersinia enterocolitica* en carne de res en puntos de venta en México por método de PCR. *Artículo de la revista México ciencia*, 4(1):107-115.
- Somma, & Querci, M. (2010). 26. *Análisis de la Presencia de Organismos Genéticamente Modificados en Muestras de Alimentos. Reacción en Cadena de la Polimerasa PCR. Sesión nº 6 M*.
- Yáñez, E., Máttar, S., & Durango, A. (2008). *Artículo Revista INFECTIO de la asociación colombiana de infectología*. Obtenido de Determinación de *Salmonella* spp. por PCR en tiempo real y método convencional en canales de bovinos y en alimentos de la vía pública de Montería, Córdoba.:  
<http://www.revistainfectio.org/site/portals/0/ojs/index.php/infectio/article>.



### XIII. ABREVIATURAS

<b>A/A.</b>	Ácido-Acido
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>APB</b>	Água Peptonada Bufferada
<b>ATR.</b>	Respuesta de Tolerancia a los ácidos
<b>CDC</b>	Centro de Control y Prevención de Enfermedades
<b>CNDR</b>	Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
<b>CT.</b>	Umbral del ciclo (Threshold cycle)
<b>ETA</b>	Enfermedades transmitidas por alimentos
<b>FRET.</b>	Energía de resonancia fluorescente
<b>HE</b>	Hektoen Entérico
<b>H<sub>2</sub>S</b>	Ácido Sulfhidrico
<b>ISO.</b>	International Organization for Standardization Organizacion internacional de normalizacion
<b>K/A</b>	Alcalino- Ácido
<b>K/K</b>	Alcalino-Alcalino
<b>LIA</b>	Lisina hierro agar
<b>MAG</b>	Ministerio Agropecuario
<b>MCHD</b>	Departamento de Salud del Condado de McLean
<b>MIFIC</b>	Ministerio de fomento, industria y comercio
<b>MINSA</b>	Ministerio de salud
<b>NaOH.</b>	Hidróxido de sodio
<b>ONPG</b>	Orto-nitrofenilgalactopiranosido
<b>OMS.</b>	Organización mundial de la salud
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>SB</b>	Sulfito bismuto
<b>SNP</b>	Polimorfismo de nucleótido simple
<b>SPP</b>	Sin especie
<b>TSI</b>	Hierro tres azucres Triple azucres y hierro
<b>XLD</b>	Xilosa Lisina Desoxicolato
<b>VETA</b>	Vigilancia de enfermedades transmitidas por alimentos

## **XIV. CONCEPTOS BÁSICOS**

### **Biotecnología**

Tecnología aplicada a los procesos biológicos

### **Bacteriemia**

Es la presencia de bacterias en la sangre.

### **Enterotoxinas**

Son el producto del metabolismo de ciertas cepas o bacilos que poseen un grado de toxico para el organismo humano.

### **Exacerbar**

Agravo o avivar una enfermedad o molestia

### **Fosfolípidos**

Son un tipo de lípidos compuestos por una molécula de glicerol, a la que se unen dos ácidos grasos (1,2-diacilglicerol) y un grupo fosfato.

### **Inoculación**

Es ubicar algo que crecerá y se reproducirá, y comúnmente se utiliza esta cabo respecto a la introducción de suero sanguíneo, una vacuna o una sustancia antígeno dentro del cuerpo de un humano o de un animal, especialmente para producir inmunidad a una enfermedad específica

**Lipopolisacárido**

Son polímeros complejos con restos de ácidos grasos como parte lipófila y cadenas características de oligosacáridos y polisacáridos

**Lote**

Cada una de las partes en las que se divide un todo para distribución con determinado fin.

**Pirógenos:**

Sustancia o agente que provoca la elevación de la temperatura corporal y la fiebre.

**Tamizaje:**

Es utilizado para indicar una estrategia aplicada sobre una población para detectar una enfermedad en individuos sin signos o síntomas de esa enfermedad.

**Tramo**

Espacio subdividido

**Taxonomía:**

Ciencia que trata de la clasificación, generalmente científica; se aplica, en especial, dentro de la biología para la ordenación jerarquizada y sistemática de los grupos de animales y de vegetales.

**Termolábiles:**

Que se altera fácilmente con la acción del calor

## XV.ANEXOS



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA**  
**UNAN. MANAGUA**



**INSTITUTO POLITECNICO DE LA SALUD**

**DR. LUIS FELIPE MONCADA**

**FICHA PARA RECOLECCIÓN DE DATOS**

Análisis de la comparación del método estándar ISO 6579-2002 con PCR Tiempo Real como prueba de Tamizaje para la detección de Salmonella spp en carne molida, CNDR-MINS, Noviembre-Diciembre 2014

Datos generales:

Sitio de muestreo:

Tramo:

Lote:

Cantidad de muestras por lote:

Peso por muestra:

Producto:

Presentación:

Aspecto:

Modo de exposición:



**Fig. 1 Ciclo de Vida**  
Toxiinfecciones bacterianas I: Salmonelosis  
Diplomado de Nutrición  
*Dr. Egea J*

## Composicion de medios

### Xilosa Lisina y Desoxicolato

Composición	Cantidad
Extracto de levadura	3g
Xilosa	3,75g
L-lisina	5g
Desoxicolato sódico	2,50g
Lactosa	7,50
Sacarosa	7,50g
Cloruro sódico	5g
Tiosulfato sódico	6,80g
Citrato férrico amónico	0,80g
Rojo fenol	0,08g
Agar	15g
Agua destilada	1.000ml

### Sulfito Bismuto

Composición	Cantidad
Peptona	12g
Extracto de levadura	3g
Cloruro sódico	5g
Sales biliares	9g
Sacarosa	12g
Lactosa	12g
Salicina	2g
Citrato férrico amónico	1,50
Tiosulfato sódico	5g
Fuchina acida	0,10g
Azul de bromotimol	0,064
Agar	14g
Agua destilada	1,000ml

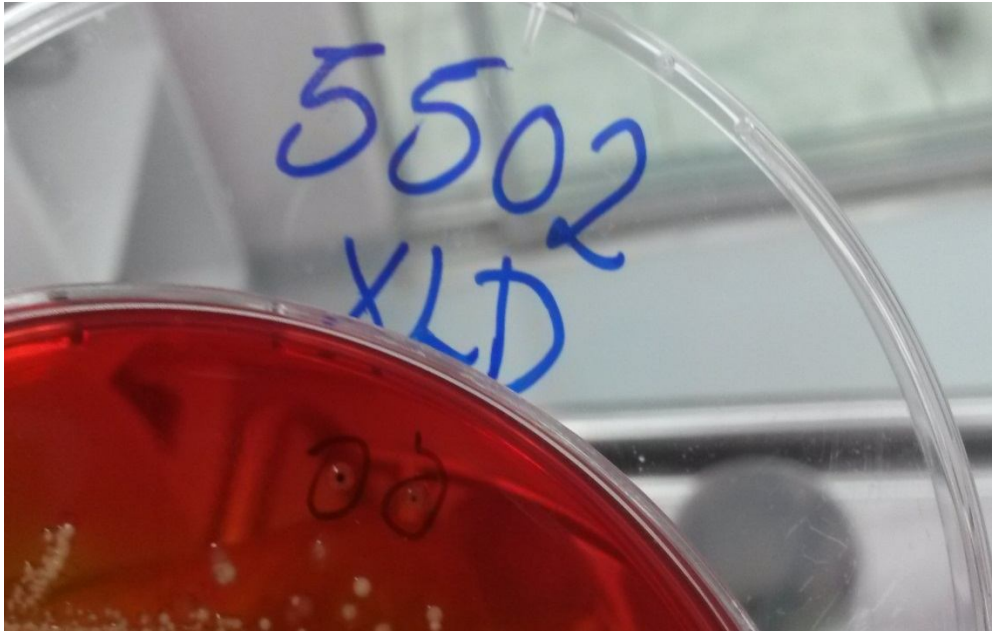
### Hektoen Entérico

Composición	Cantidad
Peptona	10g
Extracto de carne	5g
Glucosa	5g
Sulfato de hierro	0,30g
Fosfato disodico	4g
Sulfato de bismuto	8g
Verde brillante	0,025g
Agar	20g
Agua destilada	1,000ml

## Aislamiento

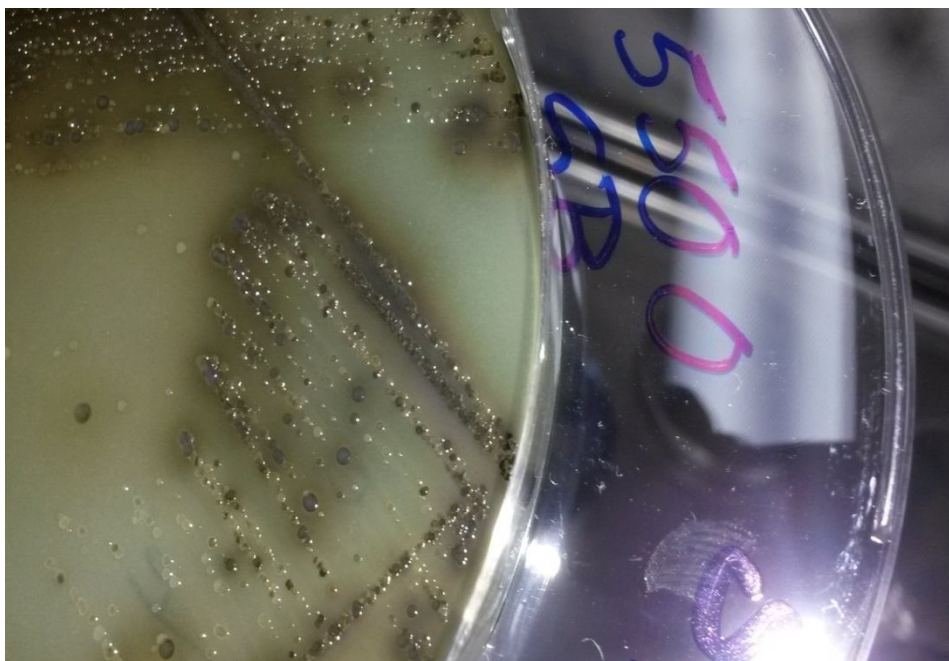
XLD (Xilosa Lisina Desoxicolato)

I





## SB (Sulfito Bismuto)



### **(HE) Hektoen Entérico**



### **Identificación en Pruebas Bioquímicas**



**Criterios establecidos por la NTON 03-880-08 para productos cárnicos**

8.0 Grupo de Alimento: Carnes y productos cárnicos. Esta categoría incluye todos los tipos de productos cárnicos, de aves de corral y caza, en piezas y cortados o picados, frescos y procesados, carnes congeladas, incluyendo empanizados y rebosados y carnes enlatadas

8.1 Subgrupo del Alimento: Productos cárnicos crudos diferentes al pollo

Parámetro	Categoría	Tipo de riesgo	Límite máximo permitido
<i>Escherichia coli</i> O157:H7/25g (carne molida, picada y tortas para hamburguesas)	10	A	Ausencia
<i>Salmonella ssp</i> 25 g	10		Ausencia
<i>Escherichia coli</i>	5		10 UFC/g

### Identificación en Pruebas Bioquímicas

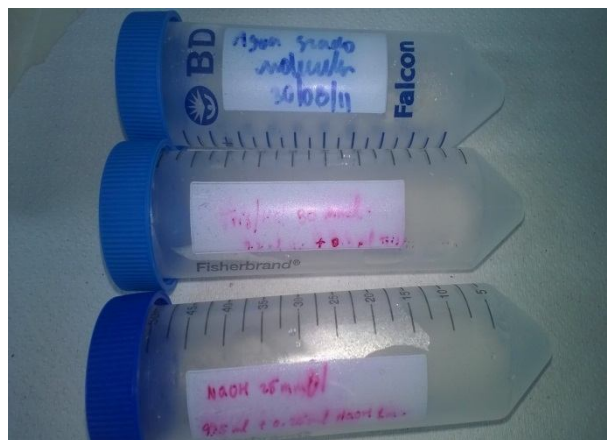
Características bioquímicas del genero <i>Salmonella spp.</i>	
Prueba	Resultado
Glucosa	+
Lactosa	-
Sacarosa	-
Lisina descarboxilasa	+
Ornitina descarboxilasa	+
Indol	-
H <sub>2</sub> S	+
VP	-
Rojo metilo	+
Urea	-
Motilidad	+

## PCR Tiempo real

### Extracción de ADN



Buffer de lisis InstaGene Matrix



Reactivos de uso para extracción  
NAOH

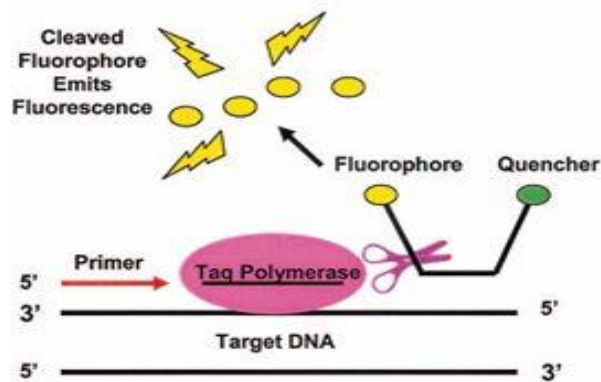


## Fase de la PCR RT



**Figura 2:**  
PCR en tiempo real.  
*Ferramola, M. 2011*

## 5'Nuclease Oligoprobe (Taqman)



**Figura: 3**  
Detección de bacterias en alimentos mediante técnicas macromoleculares.  
*Contreras Garrido, A. (2012)*

~ 07 ~

### Resultados obtenidos

Muestra	APB/IntaGen M	APB/Naoh	Rap/ IntaGen M	Rap/Naoh	Aislamiento
5227	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5228	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5229	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5230	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>N</b>	+
5231	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5500	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5501	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5502	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5503	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5504	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5585	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5586	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5587	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5588	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5589	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5590	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5591	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5592	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5593	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5594	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5596	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5597	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5598	<b>N</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5599	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+
5600	<b>P</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	+

### Resultados de sensibilidad y valor predictivo positivo en métodos de extracción de ADN a partir de APB Y Rappaport Vassiliadis

Método de extracción	S	VPP
APB-I matrix	84%	100%
APB-NAOH	68%	100%
Rappaport-I.matrix	100%	100%
Rappaport-NAOH	96%	100%

## Equipos utilizados



### **ThermoMixer C**

Para uso de viales con 1.5 ml  
máximo



### **Centrifuge 5424**

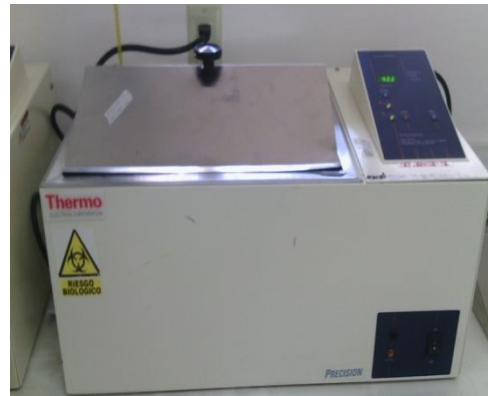
Eppendorf



Biosystems  
Step One Plus  
PCRT system –Real Time



Stomacher 400 Calculator seward  
Model 3221



Baño Maria Thermo electron  
corporation model 2864



Incubadora Thermoscientific 3221  
Model 6433



Campana de Biosiguridad labconco





Balanza metler Toledo ML1502E

Comparación del aislamiento con el PCR en tiempo Real usando el método de extracción InstaGene a partir del medio de preenriquecimiento APB.

	Aislamiento			Total
	Valores	Positivos	Negativos	
PCR Tiempo Real	Positivos	21	0	21
	Negativos	4	0	4
	Total	25	0	25

Sensibilidad: 84%

Valor predictivo positivo: 100%

Comparación del aislamiento con el PCR en tiempo Real usando el método de extracción InstaGene a partir del medio de preenriquecimiento selectivo Rappaport Vassiliadis.

	Aislamiento			Total
	Valores	Positivos	Negativos	
PCR Tiempo Real	Positivos	25	0	25
	Negativos	0	0	0
	Total	25	0	25

Sensibilidad: 100%

Valor predictivo positivo: 100%

Comparación del aislamiento con el PCR en tiempo Real usando el método de extracción NaOH partir del medio de preenriquecimiento APB Sensibilidad: 68%.

	Aislamiento			Total
	Valores	Positivos	Negativos	
PCR Tiempo Real	Positivos	17	0	25
	Negativos	8	0	0
	Total	25	0	25

Sensibilidad: 68%

Valor predictivo positivo: 100%

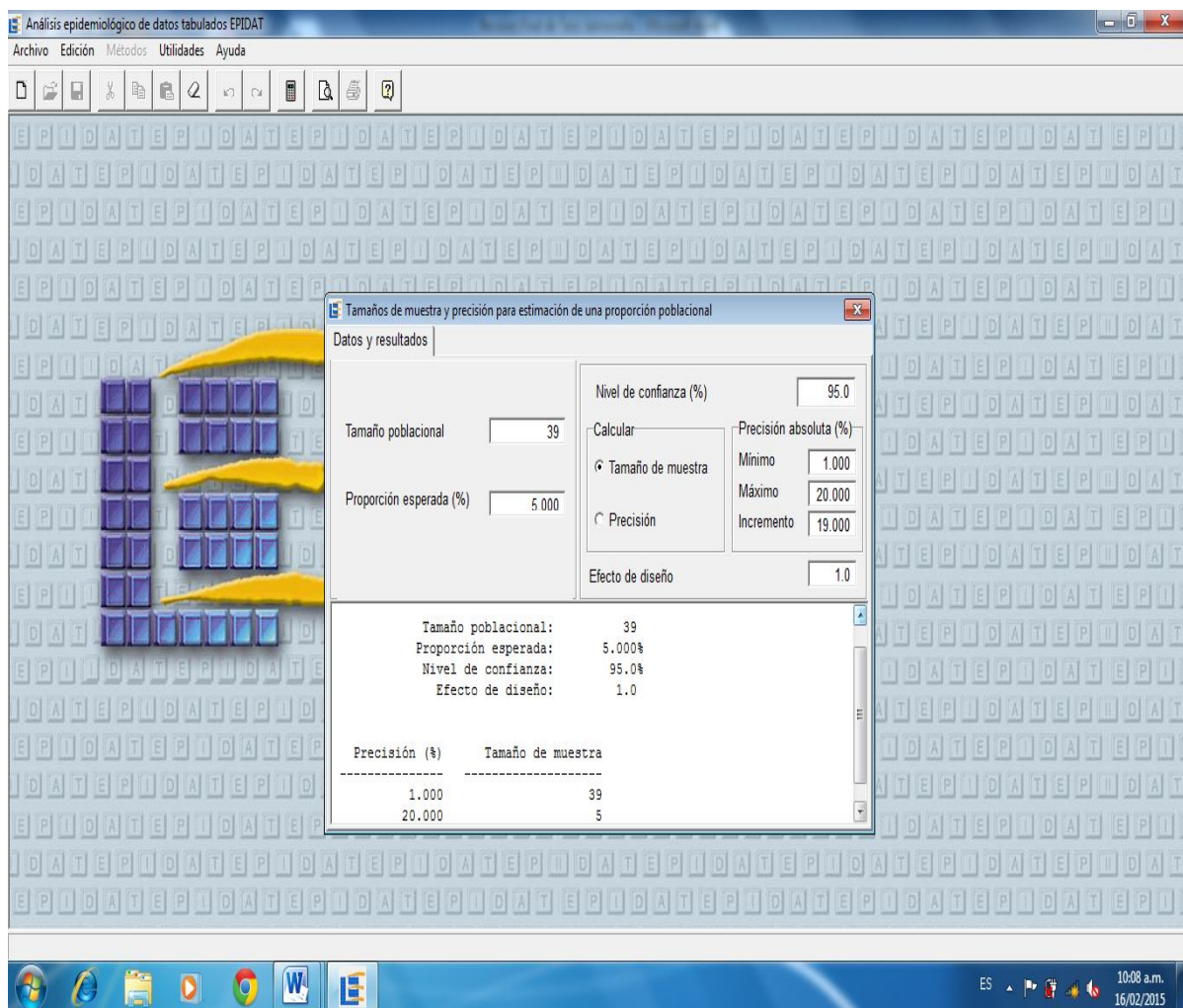
Comparación del aislamiento con el PCR en tiempo Real usando el método de extracción NaOHa partir del medio de preenriquecimiento selectivo Rappaport Vassiliadis.

	Aislamiento			Total
	Valores	Positivos	Negativos	
PCR Tiempo Real	Positivos	24	0	25
	Negativos	1	0	0
	Total	25	0	25

Sensibilidad: 96%

Valor predictivo positivo: 100%

## Epidat 3.1



### Tabla de costos

Costo de método estándar por muestra.			
Medios	Costo por gramos	Cantidad de gramos por L	Costo por prueba \$
APB	1.7	22.5	0.04
RP	2.24	27.2	0.6
XLD	2	55	2.2
SB	3.02	75	4.53
HE	4.03	79	6.36
TSI	2.07	65	0.39
LIA	1.79	29	0.15
UREA	2.87	15	0.34
TSA	2.89	40	2.312
MIO	3.85	31	0.358
Sub total			14,96
Polivalente	Costo por un mL 827		1.49
Total			16.45

Costo de PCR TR por muestra	
Descripción	Costo \$ Por Prueba
TaqMan Fast universal PCR master Mix (2x)	0.13
Sonda (ttr-5) FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTT DarkQuencher	1.18
IntanGene Matrix	0.234
TaqMan internal positive	0.20
Primers	1.9
Total:	3.04